



Universitat Jaume I

Departamento de Química Física y Analítica

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas

**APLICACIONES DE LC-MS/MS EN LA DETERMINACIÓN DE
RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y DROGAS DE ABUSO EN
MUESTRAS DE LATINOAMÉRICA.
ÉNFASIS EN LA PROBLEMÁTICA ANALÍTICA DEL GLIFOSATO**

Tesis Doctoral


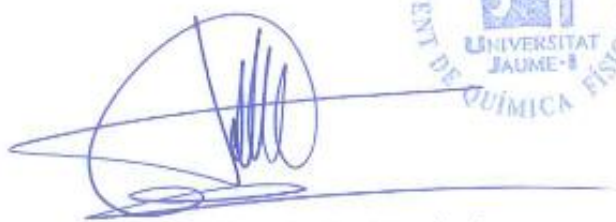
ANA MARÍA BOTERO COY

2016

El Dr. **Félix Hernández Hernández**, Catedrático de Química Analítica, y el Dr. **José Manuel Marín Ramos**, Investigador del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA).

Certifican: que la Tesis Doctoral “Aplicaciones de LC-MS/MS en la determinación de residuos de plaguicidas y drogas de abuso en muestras de Latinoamérica. Énfasis en la problemática analítica del glifosato” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón, por **Ana María Botero Coy**.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 15 de septiembre de 2015.



Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández



Fdo. Dr. José Manuel Marín Ramos

Esta tesis ha sido realizada, y posteriormente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctor en Química Analítica por la Universitat Jaume I.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por dos censores independientes, Dra. Antonia Garrido Frenich (Departamento de Química y Física, área de Química Analítica, Universidad de Almería) y Dr Ramón J. Barrio Díez-Caballero (Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco).

Los trabajos realizados en la presente memoria han sido financiados en parte por los proyectos de la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/054; ISIC/2012/016).

A mi Mami

Resumen

El modelo de agricultura actual requiere del uso de plaguicidas para mantener la producción a los niveles exigidos por una población mundial que está en continuo aumento. A pesar de sus numerosos detractores, el uso de plaguicidas es muchas veces inevitable, por lo que es habitual encontrar residuos de estos compuestos en productos vegetales y en el medio ambiente. El establecimiento de Límites Máximos de Residuos (MRLs) es uno de los aspectos más importantes en el proceso de autorización de productos fitosanitarios. Para vigilar el cumplimiento de MRLs en alimentos, es necesario implantar rigurosos programas de control, principalmente en productos vegetales. Para ello, se debe disponer de metodologías analíticas avanzadas, apropiadamente validadas, que sean capaces de detectar, identificar y cuantificar todo tipo de plaguicidas a niveles de concentración del orden de (sub)mg/kg. Los métodos analíticos deben incluir también metabolitos relevantes cuando están contemplados en la definición de residuo. Los acoplamientos cromatografía (tanto de gases como de líquidos)/espectrometría de masas son absolutamente fundamentales para este fin.

Los MRLs surgen como una exigencia de la sociedad actual, y son de obligado cumplimiento. Pero muchas veces suponen una verdadera traba comercial, sobretodo en el mercado internacional, pues la superación de un MRL hace que el producto exportado no pueda comercializarse, debiendo ser destruido o devuelto a su país de origen. Por ello, es importante que todos los productos vegetales cuenten con los estudios requeridos para el establecimiento de MRLs, los cuales deben realizarse bajo los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). En ausencia de dichos estudios, se suele establecer un MRL por defecto, correspondiente al límite de cuantificación (LOQ) del método analítico propuesto por el fabricante. En la práctica, esto implica que, si el plaguicida se aplica sobre el cultivo en cuestión, será muy probable que queden residuos y que se supere el MRL. Esta situación afecta a muchas frutas tropicales de Latinoamérica para las que los MRLs se han estimado por extrapolación a partir de frutas semejantes o bien se han fijado por defecto en el LOQ del método. La ausencia de metodologías analíticas para frutas tropicales es un hándicap importante, tanto para el establecimiento de MRLs como para el control de residuos en productos de consumo doméstico, y también en los destinados a la exportación.

En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado metodología analítica avanzada para frutas tropicales de elevado consumo en Colombia y de alto interés en sus exportaciones. Además de los métodos desarrollados para frutas tropicales, se ha trabajado también en la determinación de plaguicidas en suelos latinoamericanos. Una parte importante de la Tesis se ha centrado en la problemática analítica del glifosato, el herbicida más utilizado del mundo, cuyas dificultades analíticas son bien conocidas. La técnica usada en todos los trabajos ha sido cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo, considerada técnica de referencia en la actualidad para la determinación de plaguicidas y metabolitos/productos de transformación, la mayoría de los cuales son de polaridad media-alta y baja volatilidad, adecuados, por tanto, para ser abordados por esta técnica.

Después de una Introducción General (**Capítulo 1**), en la que se discuten diversos aspectos de interés sobre el tema tratado en la Tesis, el trabajo experimental se ha organizado en tres partes bien diferenciadas.

En la **primera parte (Capítulo 2)**, se desarrolla metodología multirresidual para la determinación de plaguicidas en frutas tropicales y en suelos de Latinoamérica. Los dos primeros trabajos corresponden al desarrollo y validación de métodos multirresiduo para frutas exóticas provenientes de Colombia, que son de vital importancia para el país pues gran parte de sus exportaciones agrícolas están centradas en este tipo de productos. De acuerdo con la bibliografía, la mayoría de frutas tropicales estudiadas no disponían de métodos publicados para residuos de plaguicidas. En esta Tesis se pretende que los métodos sean sencillos y rápidos, con la menor manipulación de muestra posible, con el objeto de minimizar errores analíticos, y poderlos transferir fácilmente a laboratorios de Latinoamérica. En el primer método (**artículo científico 1**) se escogió una extracción con acetonitrilo, usando trituración/homogeneización con Ultraturrax. El LOQ objetivo (nivel más bajo validado con muestras fortificadas sometidas al proceso analítico completo) fue 0.05 mg/kg. El método se desarrolló para 29 plaguicidas en siete frutas tropicales (uchuva, maracuyá, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya y granadilla). En el segundo método (**artículo científico 2**), se amplió el número de matrices tropicales hasta doce, añadiendo cinco más de frecuente consumo en Colombia (lulo, carambolo, feijoa, mangostán y guayaba). El número de compuestos estudiados se redujo a 20, considerando los más detectados en el primer estudio y también metabolitos incluidos en la definición de residuo. Para la extracción se aplicó el

procedimiento QuEChERS, en su versión Europea (CEN 2009), basada en el uso de tampón citrato. El objetivo fue rebajar el LOQ hasta 0.01 mg/kg, que es el valor más bajo incluido normalmente en los MRLs.

En ambos trabajos, se prestó especial atención al estudio del efecto matriz y a posibles estrategias para una corrección sencilla y de fácil aplicación en laboratorios de rutina. Se propusieron dos procedimientos para su corrección: 1) calibrado en matriz, agrupando varios tipos de muestras y escogiendo una de ellas como matriz representativa para la preparación de la curva de calibrado (gulupa, pitahaya y tamarillo se analizaron usando calibrado en matriz de gulupa; maracuyá, papaya y granadilla, usando calibrado de maracuyá; y uchuva, usando su propio calibrado en matriz); 2) calibrado en solvente, aplicando factores de corrección para cada combinación analito/matriz, basados en las diferencias de pendientes entre calibrado en matriz y calibrado en solvente.

En ambos métodos, se procedió a la validación a los niveles de LOQ y 10xLOQ con resultados satisfactorios para la mayoría de plaguicidas y matrices (recuperaciones entre 70 y 120%, RSD < 20%). Por último, los métodos desarrollados se aplicaron al análisis de muestras reales, introduciendo numerosas muestras control de calidad (QC) para asegurar la robustez y fiabilidad del método en su aplicación al análisis de estas muestras.

Este capítulo finaliza con el desarrollo de metodología analítica multirresiduo para suelos agrícolas de Argentina, siguiendo la misma filosofía de trabajo en cuanto al tratamiento de la muestra (**artículo científico 3**). En colaboración con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Balcarce (Argentina), se seleccionaron 18 plaguicidas de amplio uso en Argentina y se estudiaron 11 suelos representativos de ese país. Se empleó una sencilla extracción sólido-líquido con acetonitrilo usando agitación mecánica seguida de ultrasonidos. Después de una centrifugación, el extracto del suelo se diluyó x 2 con H₂O y se inyectó directamente en el sistema LC-MS/MS. En este trabajo se evaluó el efecto matriz para los 11 suelos estudiados. El método se validó satisfactoriamente a 0.5 y 0.05 mg/kg, siendo este último el LOQ objetivo del método. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo con patrones en solvente. En su aplicación a los suelos objeto de estudio, se incluyeron QCs para cada suelo analizado. Las recuperaciones de los QCs fueron satisfactorias en la gran mayoría de combinaciones analito/suelo. Con ello, la metodología desarrollada fue

testada y validada demostrando su “universalidad” para suelos muy diferentes, con notables variaciones en sus características físico-químicas.

En todos los métodos multirresiduo desarrollados en este capítulo, se adquirieron dos transiciones por compuesto y se evaluaron las relaciones de intensidad (ion ratio), con el fin de asegurar la correcta identificación de los compuestos detectados en las muestras.

En la **segunda parte** de la Tesis (**Capítulo 3**) se aborda la problemática analítica del herbicida glifosato en suelos latinoamericanos, por un lado, y en productos vegetales (principalmente cereales), por otro. Los trabajos llevados a cabo en suelos condujeron a la publicación de un artículo (**artículo científico 4**), cuyo objetivo fue desarrollar un método rápido, robusto y mejorado para residuos de glifosato y su principal metabolito AMPA en suelos complejos, con altos contenidos de materia orgánica. Las muestras estudiadas fueron tomadas de Argentina y Colombia, países en los que este herbicida es utilizado con regularidad para el control de malezas y/o para la erradicación de cultivos ilícitos de coca. Cabe destacar que en Argentina la soja transgénica, resistente al glifosato, representa la práctica totalidad de la soja cultivada, con lo que el consumo de glifosato, principalmente mediante aplicaciones aéreas, es muy elevado.

El análisis de suelos se realizó sobre la base de los trabajos previos de nuestro grupo, en lo relativo a la extracción y a las condiciones de derivatización con FMOC. La investigación se centró en la etapa de *clean-up*, la cual resultó crítica debido al fuerte efecto matriz observado en estos suelos (supresión de ionización del orden del 90%, e incluso mayor), que no se había observado en los suelos españoles analizados hasta entonces. Para ello, se aplicó SPE probando dos tipos de sorbentes (Oasis MAX y HLB), a diferentes pH, antes y después de la derivatización con FMOC. Los mejores resultados se obtuvieron con Oasis HLB, realizando el *clean-up* del extracto del suelo antes de derivatizar con FMOC, previo ajuste a pH 9. En estas condiciones, tanto glifosato como AMPA, pasaron a través del cartucho Oasis HLB sin sufrir retención, y la derivatización se realizó sobre el eluato no retenido después de pasar por el cartucho de SPE. El uso de patrón interno marcado de glifosato fue fundamental para poder cuantificar correctamente. El método se validó en cuatro suelos, dos Argentinos y dos Colombianos, a dos niveles de concentración (0.5 y 5.0 mg/kg). El límite de cuantificación (LOQ) objetivo fue 0.5 mg/kg.

Se analizaron 26 suelos de diferentes áreas de Colombia (15) y Argentina (11). Para garantizar la calidad de los análisis se intercalaron varias muestras QC, cuyas recuperaciones fueron en general satisfactorias. Los suelos Colombianos fueron particularmente problemáticos, especialmente para el AMPA, para el que no se cumplía la relación de intensidades entre las transiciones adquiridas (Q/q) en varias muestras. Ambos compuestos se detectaron en el 90% de las muestras, encontrándose las concentraciones más altas en los suelos de Colombia. Todos los positivos se confirmaron usando, al menos, dos transiciones MS/MS, siendo necesario que la relación Q/q y el tiempo de retención estuvieran dentro de las tolerancias máximas admitidas en las guías SANCO. Se observó que en varios suelos las transiciones medidas estaban interferidas por componentes co-extraídos, por lo que fue importante adquirir todas las transiciones posibles, con el fin de disponer de alternativas en caso de interferencias. La situación del AMPA fue aún más problemática en términos de confirmación, ya que tan sólo se pudieron optimizar dos transiciones, y una de ellas (la de cuantificación) estaba interferida en la mayoría de las muestras, hecho que dificultó en gran medida los análisis. En nuestro trabajo se sugiere aumentar la tolerancia en la relación Q/q hasta $\pm 50\%$, como valor más realista para la identificación en este tipo de análisis.

En el segundo trabajo (**artículo científico 5**) se desarrolla metodología analítica para la determinación de residuos de glifosato en cereales y soja. El trabajo se centró exclusivamente en glifosato, ya que en la definición de residuos propuesta por la EFSA no incluye su principal metabolito AMPA. El objetivo principal fue evitar la etapa de derivatización, intentando la determinación directa del herbicida. Para ello, se probaron diferentes columnas de LC, seleccionando finalmente la *mix-mode* Obelisc N, que fue la que proporcionó mejor retención para este compuesto. Las matrices objeto de estudio se seleccionaron entre las de mayor interés por la posible presencia de este compuesto (arroz, soja y maíz), y que además se encuentran entre las de mayor uso en transgénicos resistentes al glifosato. La metodología desarrollada también se aplicó a muestras de trigo, maíz, gluten de maíz y guisantes.

Este trabajo fue encaminado a realizar el menor tratamiento posible de muestra, intentando alcanzar un compromiso entre efecto matriz aceptable y menor tiempo de análisis. La extracción del glifosato en las muestras se hizo con agua mediante ultrasonidos. En matrices con alto contenido en grasa (maíz, soja) se añadió una partición líquido-líquido con diclorometano y, en el caso de la soja, se procedió a la eliminación de las proteínas mediante precipitación con acetonitrilo. Como en el resto de trabajos realizados en la Tesis, se dedicó

especial atención al estudio del efecto matriz, que fue notorio en las matrices de maíz y soja, con fuertes supresiones de señal.

La metodología desarrollada se validó a dos niveles de concentración, con LOQ objetivos de 0.1 mg/kg para arroz y maíz, y 2 mg/kg para soja, valores altos pero suficientes para controlar el cumplimiento de MRLs en la Unión Europea. El uso del patrón interno marcado fue clave para la cuantificación correcta del analito, al corregir el efecto matriz aún observado después del tratamiento de muestra, especialmente en soja y maíz.

La ventaja de este método es que no resulta necesaria una etapa previa de derivatización, pero su principal inconveniente es la poca robustez y rápida degradación observada en la columna Obelisc N, más evidente a mayor complejidad de la matriz inyectada (ej. soja). Este hecho, unido a su elevado precio, hace que, de momento, este método sea poco atractivo para análisis de rutina, a pesar de proporcionar resultados analíticos satisfactorios. Cabe esperar que, en un futuro próximo, aparezcan nuevas columnas, más robustas y menos costosas, que permitan la separación cromatográfica del glifosato sin los inconvenientes mencionados.

Finalmente, para completar el trabajo con la técnica LC-MS/MS y ampliar su campo de aplicación a nivel de residuos, en la **tercera parte de esta Tesis** se ha abordado (**Capítulo 4**) la determinación de drogas de abuso en aguas residuales urbanas (cocaína, su principal metabolito benzoylecgonine (BE), anfetamina, metanfetamina, el principal metabolito del cannabis 11-nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH), ketamina, 6 Monoacetylmorphine (6 MAM) y 3,4-methylen-dioxy-metamphetamine (MDMA, éxtasis). En este caso, se hizo uso de metodología analítica ya desarrollada por nuestro grupo de trabajo, por lo que la investigación se centró en el tratamiento e interpretación de los resultados obtenidos en el análisis de aguas residuales (influyente urbano) de las ciudades de Castellón y Murcia, por un lado, y Bogotá y Medellín, por otro. El objetivo del trabajo fue determinar los niveles de concentración de drogas en las aguas y, a partir de los resultados obtenidos, estimar la carga diaria de estas drogas en las aguas residuales de estas poblaciones. En aquellos casos en los que se disponía de información suficiente y contrastada sobre la excreción del metabolito/biomarcador en orina, se pudo hacer una estimación del consumo de droga en la población (caso de la cocaína y su metabolito BE). Este tipo de estimaciones se enmarcan en lo que se conoce como epidemiología de las aguas residuales (*Wastewater-Based Epidemiology*, WBE).

Los resultados obtenidos en esta Tesis mostraron que en todas las ciudades los niveles más altos, con diferencia, correspondían a la BE, con muchas muestras superando los 1000 ng/L (1 ppb). Las concentraciones de BE fueron más altas en las aguas residuales de Colombia, que también presentaron unos niveles altos de cocaína, considerablemente superiores a los de las dos ciudades españolas. Cabe destacar los niveles relativamente altos de THC-COOH, cuyas concentraciones en las aguas de las ciudades españolas y colombianas fueron bastante similares (concentraciones en general entre 100 y 300 ng/L). Además de estas dos drogas, que parecen ser las más consumidas por la población, se detectó MDMA en la mayoría de muestras, a concentraciones por debajo de 30 ng/L, excepto en el fin de semana en Bogotá en donde alcanzó los 60 ng/L. La ketamina sólo se detectó en las muestras de Colombia, en concentraciones inferiores a 30 ng/L.

Se pudo estimar el consumo medio de cocaína a partir de los datos de BE en las aguas residuales teniendo en cuenta su excreción media en orina. El valor estimado para Castellón (550 mg/día/1000h) y Murcia (850) fue semejante al reportado en estudios realizados en 2011 para ciudades españolas. El consumo en Bogotá pareció encontrarse también en esta misma línea (750), por debajo de ciudades europeas como Amberes o Ámsterdam, en donde llega hasta casi 2000 mg/día/1000h. Sin embargo, Medellín estuvo por encima de todas las ciudades europeas, con un valor medio de 3000 mg/día/1000h.

En cuanto al cannabis, las cargas medias encontradas para su biomarcador THC-COOH en las aguas residuales fueron semejantes en las cuatro ciudades estudiadas (entre 33 y 49 mg/día/1000h). Estos valores son del mismo orden que los encontrados en Milán, Bratislava, Sarajevo, Zagreb, Amberes, Bruselas, Praga o Valencia, pero inferiores a los de Barcelona, París, Eindhoven, Utrecht o Ámsterdam, todos ellos con cargas próximas o ligeramente superiores a 100 (200 en el caso de Ámsterdam, ciudad en la que es conocida su política liberal en el consumo de cannabis).

Las cargas medias de MDMA fueron bajas en comparación con las de cannabis y BE, y semejantes en las cuatro ciudades (valores medios entre 1.5 y 4.4 mg/día/1000h). Estos resultados están en la línea de los reportados en ciudades como Zagreb, Milán, Oslo, Valencia, Castellón o Santiago, y son significativamente inferiores a los reportados en Barcelona, Amberes, Zúrich, Londres o Ámsterdam, ciudades en las que frecuentemente se superan los 30-50 mg/día/1000h.

La ketamina tan sólo se detectó en las aguas de Colombia, en las dos ciudades estudiadas Bogotá y Medellín, con valores medios de 3.8 y 1.5 mg/día/1000h, respectivamente.

Cabe destacar que los datos obtenidos en esta Tesis son los primeros reportados en la bibliografía sobre ciudades de Colombia.

Summary

In this Thesis, advanced analytical methodology has been developed for pesticide residues in tropical fruits widely consumed at Colombia and of high interest for exportations to the EU. In addition, analytical methodology for the determination of pesticide residues in soils from Latino America has been also developed. An important part of this Thesis has been dedicated to the herbicide glyphosate, whose analytical difficulties at the residue level are well known. The technique applied in all the methods developed was LC-MS/MS with triple quadrupole, which is considered the technique of reference at present for the determination of the wide majority of pesticides and metabolites (mostly of medium-high polarity and low volatility).

After a **general introduction (Chapter 1)**, where several relevant aspects related to the subject treated in this Thesis are discussed, the experimental work has been organized in three parts.

In **the first part (Chapter 2)**, multi-residue methodology for the determination of pesticides in tropical fruits and soils from Latino America has been developed. The first two papers correspond to method development and validation in tropical fruits from Colombia. An important part of the products exported to the EU from that Country correspond to the tropical fruits studied in this work. However, despite the economic interest of these products very little information exists in the bibliography on determination of pesticide residues in these tropical fruits. Therefore, in this Thesis we pursued to report for the first time multi-residue methods specifically directed towards tropical fruits, including a notable number of sample matrices. The objective was the development of simple and rapid methods, with little sample manipulation, that could be easily implemented in laboratories from Latino America. In the first method developed (**scientific article 1**), a simple extraction with acetonitrile using Ultraturrax was selected. The LOQ objective (lowest level validated in fortified samples following the overall procedure) was 0.05 mg/kg. The method was developed for 29 pesticides in 7 tropical fruits (uchuva, maracuyá, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya and granadilla). In the second method (**scientific article 2**) the number of matrices was widened up to 12, adding five products widely consumed in Colombia (lulo, carambolo, feijoa, mangostán and guayaba). The number of target compounds was reduced to 20, including only the most frequently detected in the first study and also a few more compounds detected by other authors in some tropical fruits, as well as several metabolites included in the residue

definition. The QuEChERS procedure (European version, CEN 2009), based on the use of citrate buffer, was selected in this case for extraction of samples. The LOQ objective was decreased down to 0.01 mg/kg, the lowest value normally applied for MRLs.

In both methods, a detailed study on matrix effects and possible strategies for their correction was made. Two procedures of easy application were proposed for an efficient correction: 1) calibration in matrix, grouping several matrices and selecting one of them as representative for preparation of the calibration in matrix (gulupa, pitahaya and tamarillo were analysed using calibration in matrix with gulupa; maracuyá, papaya and granadilla, using calibration in maracuyá; uchuva, using its own calibration in matrix); 2) calibration in solvent, applying correction factors for each analyte/matrix combination based on the differences in slopes between calibration in matrix and in solvent.

The two methods were validated at the LOQ and 10xLOQ levels with satisfactory results (recoveries between 70-120%, RSD < 20%). Finally, the analytical methodology developed was applied to real-world samples, including several Quality Control samples in every sample sequence to ensure the robustness and reliability of the methods during application to samples analyses.

This chapter ends up with the development of a multi-residue method for pesticides in agricultural soils from Argentina following a similar strategy in relation to the sample treatment (**scientific article 3**). In collaboration with the *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)* (Balcarce, Argentina), 18 pesticides widely applied and 11 soils from agricultural areas of Argentina were selected. After extraction of the soil with acetonitrile (shaking plus ultrasounds), the soil extract was 2-fold diluted with water and injected directly into the LC-MS/MS system. Matrix effects were evaluated for the eleven soils under study, and the method was successfully validated at 0.5 and 0.05 mg/kg, the latter being the LOQ objective of the method. Quantification was made by external calibration with standards in solvent. In analysis of samples, QCs were included for each soil analysed obtaining satisfactory recoveries for the great majority of analyte/matrix combinations. In this way, the analytical methodology developed was tested and validated for very different soil samples demonstrating its universality and robustness.

In all multi-residue methods included in this chapter, two MS/MS transitions were acquired for each compound and their ion ratios were evaluated to ensure a reliable identification of the compounds detected in samples.

The **second part of the Thesis (Chapter 3)** deals with the determination of glyphosate in soils from Latino America and in vegetables (mainly cereals). Two scientific articles are included in this chapter. The **scientific article 4** reports the development of an improved method for the determination of GLY and its metabolite AMPA in soils from Colombia and Argentina, which were found highly problematic for residue determination of these two compounds. The method was based on previous works of our group as regards soil extraction and FMOc derivatization conditions. Thus, the research was focused on the clean-up step, which was found critical due to the strong matrix effects (ionization suppression of around 90%, or even higher), a fact that was not observed in Spanish soils previously analysed in our laboratory. To this aim, SPE was applied testing several types of sorbents (OASIS MAX y HLB), loading the sample extract before and after derivatization with FMOc, and at different pH. The best results were obtained with OASIS HLB, performing the clean of the soil extract adjusted to pH 9 without previous derivatization. Under these conditions, both GLY and AMPA passed throughout the cartridge without retention and the derivatization was subsequently made on the non-retained extract. The use of isotope-labelled internal standard of GLY was essential for correct quantification. The method was validated in four soils, two from Colombia and two from Argentina, at two fortification levels (5.0 and 0.5 mg/kg). The LOQ objective was 0.5 mg/kg.

The methodology was applied to 26 samples from different areas of Colombia (15 soils) and from Argentina (11 soils). Several QCs were also analysed together with the samples with satisfactory recoveries in general. Soils from Colombia were found more problematic, especially for AMPA, for which the ion ratios did not fit with those expected from standards in several of the soils. Both compounds were found in 90% of the samples, commonly at higher concentrations in those from Colombia. All positive findings were confirmed using at least two transitions. However, in several samples some transitions were interfered by co-extracted components from the matrix. For this reason, it was important to acquire all available transitions to have other options in case of interferences. The confirmation of AMPA was still more problematic, as only two transitions were available, and one of them was

interfered in many samples. From data obtained in this work, we suggested to increase the tolerance of the Q/q ratio up to 50% as a more realistic value for this problematic analysis.

In the second work (**scientific article 5**), analytical methodology was developed for the direct determination of GLY (without derivatization) in vegetable samples (cereals and soya). The main objective was to avoid the derivatization step, and to this aim several LC columns designed for retention of polar compounds were tested. The mix-mode *Obelisc N* column provided the best retention for GLY and was selected for further optimization of the direct method. Sample matrices initially studied were rice, soya and maize. After optimization and validation the method was also applied to other matrices as wheat and peas.

The work was oriented towards little simple manipulation trying to reach a compromise between acceptable matrix effects and short analysis time. Extraction of samples was carried out with water and ultrasounds. In those samples with high fat content, a liquid-liquid partitioning with dichloromethane was also applied, and protein precipitation with acetonitrile was added for soya. As in the rest of methods developed in this Thesis, especial attention was paid to matrix effects, which were quite relevant in maize and soya samples, with strong ionization suppression.

The method was validated at two concentration levels, with LOQ objective of 0.1 mg/kg for rice and maize, and 2 mg/kg for soya, which were sufficient for monitoring the compliance of EU MRLs in these matrices. The use of ILIS was essential for the accurate quantification in order to correct the remaining matrix effects (especially for maize and soya) as well as potential variations in the response along the sample analysis.

The main advantage of this method was the absence of derivatization step, but there were important drawbacks, such as the lack of robustness and the rapid degradation of the *Obelisc N* column with its use, which was more evident when injecting complex matrix extracts (e.g. soya). These facts together with the high cost of this column limit the applicability in routine analysis at the moment. With some improvements in these columns (e.g. better robustness and lower price), the method might be efficiently applied in the near future for residue determination of glyphosate in different types of samples.

Finally, in order to complete the LC-MS/MS work in the field of organic contaminants/compounds at trace level, the **third part of the Thesis (Chapter 4)** was

devoted to the determination of illicit drugs in urban wastewaters. The compounds selected were drugs of common consumption, as cocaine, its major metabolite, benzoylecgonine (BE), amphetamine, methamphetamine, the major metabolite of cannabis, THC-COOH, ketamine, 6 MAM y MDMA (ecstasy). Analyses were performed by LC-MS/MS QqQ applying analytical methodology previously developed by our group. Thus, the research was focused on the results obtained and on interpretation of these data. Analyses were made on 24-h composite samples collected along a whole week in the cities of Castellon and Murcia, by one side, and Bogotá and Medellin, by other side. The objective was to estimate the drugs consumption in these cities from data obtained in raw influent wastewater. This work makes use of the approach named Wastewater-Based Epidemiology (WBE) or also Sewage-Based Epidemiology (SBE).

Data obtained in this Thesis showed that BE was by far the compound at higher concentrations in the wastewaters of the four cities under study. Several samples analysed exceeded 1000 ng/L (1 ppb) for this cocaine metabolite. The BE concentrations in Bogotá and Medellin were significant higher than in the Castellon and Murcia. The concentrations found for THC-COOH were relatively high, and rather similar in the four cities (commonly between 100 and 300 ng/L). In addition to cannabis and cocaine biomarkers (these two drugs seemed to be the most consumed by population), MDMA was also detected in the majority of samples, typically at concentrations below 30 ng/L. Ketamine was only detected in the Colombian samples, at concentration lower than 30 ng/L.

From BE concentrations in wastewater, it was possible to estimate the cocaine consumption by the population taking into account the excretion data (29% cocaine excreted as BE). The estimated normalized value for Castellón (550 mg/day/1000inh) and Murcia (850) was similar to that reported for Spanish towns in previous studies performed in 2011. The consumption in Bogotá was rather similar (750), and below European cities as Antwerp or Amsterdam, where values up to 2000 mg/day/1000inh have been reported in previous studies. However, Medellin was above all the values reported for European cities, with a mean value of 3000 mg/day/1000inh.

In relation to cannabis, the average loads of its biomarker THC-COOH in wastewaters were similar in the four cities (between 33 and 49 mg/day/1000inh). These values were of the same order than those reported for Milan, Sarajevo, Zagreb, Antwerp, Brussels, Prague or

Valencia, but lower than for Barcelona, Paris, Eindhoven, Utrecht or Amsterdam, the latter with loads near or slightly higher than 100 (200 in Amsterdam, where the liberal policy on cannabis consumption is well known).

Average loads for MDMA were low in comparison with THC-COOH and BE, and similar in the four cities (between 1.5 and 4.4 mg/day/1000inh). These data are in the line of those reported previously for European cities such as Zagreb, Milan, Oslo, Valencia, Castellon or Santiago, but significantly lower than those for Barcelona, Antwerp, Zurich, London or Amsterdam, where 30-50 mg/day/1000inh are frequently exceeded.

Ketamine was only detected in the Colombian cities, with average loads of 3.8 and 1.5 mg/day/1000inh, respectively.

It is worth noticing that data given in this Thesis are the first reported in the scientific literature on Colombia making use of WBE approach.

Acrónimos y abreviaturas

ACN	<i>Acetonitrile</i>
ACT	<i>Acetone</i>
AcEt	<i>Ethyl acetate</i>
AMPA	<i>Aminomethylphosphonic acid</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	<i>Atmospheric Pressure Interfaces</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARP	<i>Análisis de Residuos de Plaguicidas</i>
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
ATS	<i>Amphetamine-type Stimulants</i>
BE	<i>Benzoyllecgonine</i>
BLP/ GLP	<i>Good Laboratory Practices</i>
BPA/GAP	<i>Good Agricultural Practices</i>
BOD	<i>Biological oxygen demand</i>
CEN	<i>European Committee for Standardization</i>
CEC/CIC	<i>Cation exchange capacity</i>
CNBF	<i>4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride</i>
COD	<i>Chemical oxygen demand</i>
C-P	<i>Carbono-Phosphorus</i>
DAD	<i>Diode array detection</i>
DLLME	<i>Dispersive liquid liquid microextraction</i>
DANE	<i>Departamento Administrativo Nacional de Estadística</i>
DCM	<i>Dichloromethane</i>
DPCS-Cl	<i>3,6-dimethoxy-9-phenyl-9H-carbazole- 1-sulfonyl chloride</i>
d-SPE	<i>Dispersive-Solid Phase Extraction</i>
EDAR	<i>Estación Depuradora de Aguas Residuales</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>

EI	<i>Electronic Ionization</i>
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EPSPS	<i>Enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i>
EQSD	<i>Environmental Quality Standards Directive</i>
ESI	<i>ElectroSpray Interface</i>
EU	<i>European Union</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FMOC-Cl	<i>Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride</i>
FD	<i>Fluorescent detection</i>
GAT	<i>Glyphosate-N-acetyltransferase</i>
GCB	<i>Graphitized Carbon Black</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
GLU	<i>Glufosinate</i>
GLY	<i>Glyphosate</i>
GM	<i>Genetically modified</i>
HE	<i>High Energy</i>
HF-LPME	<i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i>
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	<i>Ion-exchange Chromatography</i>
ICA	<i>Instituto Colombiano Agropecuario</i>
ILIS	<i>Isotope-labelled Internal Standard</i>
INTA	<i>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</i>

IPA	<i>Isopropilamine</i>
IT	<i>Ion Trap</i>
IUPA	Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas
IWW	<i>Influent WasteWater</i>
LPME	<i>Liquid Phase Microextraction</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-LC	<i>Coupled-Column Liquid Chromatography</i>
LCL	<i>Lowest Calibration Level</i>
LC-LC-FD	<i>Coupled-Column Liquid Chromatography with fluorescent detection</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry</i>
LC-QTOF	<i>Liquid Chromatography coupled to Quadrupole Time-of-Flight</i>
LE	<i>Low Energy</i>
LiSC	<i>Living Separation Cell</i>
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOI	<i>Limit of Identification</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LRMS	<i>Low Resolution Mass Spectrometry</i>
m/z	<i>Mass/charge ratio</i>
MDMA	<i>3,4-methylen-dioxy-metamphetamine (éxtasis)</i>
6 MAM	<i>6- Monoacetylmorphine</i>
ME	<i>Matrix Effect</i>
MOBS-F	<i>4-methoxybenzenesulfonyl fluoride</i>
MRL	<i>Maximum Residue Level</i>
MRM	<i>Multiresidue Method</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NBD-Cl	<i>4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole</i>

NH ₄ Ac	<i>Ammonium acetate</i>
NH ₄ Fm	<i>Ammonium formate</i>
NPLC	<i>Normal Phase Liquid Chromatography</i>
NPS	<i>New Psychoactive Substances</i>
NQS	<i>1,2-naphthoquinone-4-sulfonate</i>
WTO/OMC	<i>World Trade Organization</i>
OMS/WHO	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
OPA	<i>Orto- phthaldehyde</i>
PE	<i>Process efficiency</i>
PSA	<i>Primary-Secondary Amine</i>
Q	<i>Quadrupole analyzer</i>
q/Q	<i>Ion ratio</i>
QC	<i>Quality Control</i>
QqQ	<i>Triple Quadrupole analyzer</i>
QTOF	<i>Quadrupole-Time of Flight analyzer</i>
QuEChERS	<i>Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe</i>
RIVM	<i>Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu</i>
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i>
RR	<i>Roundup Ready®</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
Rt	<i>Retention time</i>
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>
S/N	<i>Signal-to-Noise ratio</i>
SOM	<i>Soil Organic Matter</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
SCORE	<i>Sewage analysis CORe group Europe</i>
HS-SPME	<i>Head-Space Solid Phase Microextraction</i>

SBSE	<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>
SDME	<i>Single-drop microextraction</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
TIC	<i>Total Ion Current</i>
TD	<i>Termodesorption</i>
THC-COOH	<i>11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid</i>
TP	<i>Transformation Products</i>
TsCl	<i>p-toluenesulphonyl chloride</i>
UHPLC	<i>Ultra-High Performance (or Pressure) Liquid Chromatography</i>
UV	<i>UltraViolet</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
WBE	<i>Wastewater-Based Epidemiology</i>

INDICE GENERAL / TABLE OF CONTENTS

Objetivos	1
<i>Objectives</i>	5

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	Determinación de residuos de plaguicidas en muestras de interés ambiental y alimentario	
1.1.1.-	Problemática general	11
1.1.2.-	Límites máximos de residuos de plaguicidas	16
1.1.3.	Tratamiento de muestra	20
1.1.4.-	Medida analítica	28
1.1.5.-	Validación de métodos analíticos	30
1.2	Métodos de análisis basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem	
1.2.1.	LC-MS/MS con analizadores de triple cuadrupolo	32
1.2.2.	Efecto matriz en LC-MS/MS	39
1.3	Trabajo realizado en esta Tesis Doctoral	44

CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN MULTIRRESIDUAL DE PLAGUICIDAS MEDIANTE LC-MS/MS

2.1 Métodos multi-residuo para la determinación de plaguicidas en frutas tropicales

2.1.1 Introducción 51

2.1.2 Artículo Científico 1

Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2287-2300.

2.1.3 Artículo Científico 2 67

Exploring matrix effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticides residues in tropical fruits. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3667-3681. 97

2.1.4 Discusión de los resultados

Optimización de las condiciones MS/MS	141
Optimización cromatográfica	142
Tratamiento de muestra	143
Estudio del efecto matriz	144
Validación del método	150
Análisis de muestras.	152

2.2.- Método multi-residuo para la determinación de plaguicidas en suelos Argentinos

2.2.1.- Introducción 157

2.2.2.- Artículo científico 3

Simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina. *Anal. Methods*: 7 (2015) 9504-9512 165

2.2.3.- Discusión de resultados

Optimización cromatográfica y de las condiciones MS/MS	199
Tratamiento de muestra, estudio del efecto matriz	203
Validación del método	207
Análisis de muestras.	209

CAPÍTULO 3.- DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE GLIFOSATO Y AMPA EN SUELOS Y PRODUCTOS VEGETALES MEDIANTE LC-MS/MS

3.1. Introducción

215

3.2. Método desarrollado para la determinación de glifosato y AMPA en suelos procedentes de Colombia y Argentina

3.2.1. Artículo Científico 4

Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1292 (2013) 132-141.

245

3.2.2. Discusión de los resultados

Optimización cromatográfica y de las condiciones MS/MS	277
Tratamiento de muestra	281
Estudio de la etapa de <i>clean up</i> : efecto matriz	282
Validación del método	289
Análisis de muestras.	290

3.3. Método desarrollado para la determinación directa de glifosato y AMPA en cereales

3.3.1 Artículo Científico 5

Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *J. Chromatogr. A.* 1313 (2013)157-165. 295

3.3.2 Discusión de los resultados

Optimización de las condiciones MS y MS/MS	320
Optimización cromatográfica	323
Tratamiento de muestra, estudio del efecto matriz	324
Validación del método	329
Análisis de muestras.	330

CAPÍTULO 4.- INVESTIGACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN AGUAS RESIDUALES URBANAS: ESTIMACIÓN DEL USO DE DROGAS EN UNA POBLACIÓN

4.1.- Introducción: epidemiología de aguas residuales	335
4.2.- Experimental	350
4.3.- Discusión de los resultados	356

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Conclusiones	381
Conclusions	387

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	395
SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	431
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON LA TESIS	433
Agradecimientos	435

Objetivos



Objetivos

El **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo, validación y aplicación de metodología analítica moderna para análisis de residuos de plaguicidas (ARP) en muestras de interés alimentario y ambiental. Para ello, se ha hecho uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QQQ). El trabajo se ha centrado en muestras procedentes de Latinoamérica, concretamente de Colombia y Argentina.

Los **objetivos específicos** de la Tesis han sido los siguientes:

1. Desarrollar metodología analítica multirresidual, basada en LC-MS/MS (QQQ), para la determinación de residuos de plaguicidas de amplio uso en Colombia, así como de sus principales metabolitos, en frutas exóticas de este país (uchuva, maracuyá, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya, granadilla, lulo, carambolo, feijoa, mangostán y guayaba). Con ello, se pretende aportar información relevante sobre este tipo de frutas, para las que apenas existen métodos publicados de ARP, y ayudar con ello a ejercer el control sobre estos productos, tanto los de uso doméstico como los productos destinados a la exportación. A su vez, se persigue aplicar en estos métodos tratamientos de muestra sencillos, de fácil implementación en laboratorios de control, evitando en lo posible la excesiva manipulación de la muestra. Para ello, se hará uso de extracción sólido-líquido con sistemas Ultraturax o del procedimiento QuEChERS.
2. Realizar un estudio detallado del efecto matriz en las diversas frutas tropicales ensayadas y proponer posibles soluciones para corregir dicho efecto. En métodos multirresiduo, la corrección con patrones internos marcados resulta problemática, motivo por el cual se buscarán otras soluciones sencillas, pero eficaces, basadas en una aproximación indirecta del calibrado en matriz a través de factores de corrección

resultantes de la diferencia de pendientes entre calibrados en solvente y en matriz, o de la selección de matrices representativas para el calibrado.

3. Desarrollar metodología analítica multirresidual basada en LC-MS/MS QqQ para ARP en suelos agrícolas argentinos y comprobar su aplicabilidad y robustez en un número notable de suelos con diferentes características, con el objetivo último de implementarla en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Balcarce (Argentina). Esta metodología se desarrollará para plaguicidas de amplio uso en las prácticas agrícolas de Argentina.
4. Validar la metodología analítica multirresidual desarrollada siguiendo las guías SANCO de la EU, y aplicarla a muestras de suelos y frutas tropicales provenientes de Latinoamérica, incluyendo en las secuencias diversas muestras control de calidad (QC) con el fin de comprobar la fiabilidad y robustez de los métodos. Usar criterios rigurosos para confirmar la identidad de los positivos encontrados en las muestras, adquiriendo, al menos, dos transiciones por compuesto y evaluando las relación de intensidades (Q/q ratio).
5. Desarrollar metodología analítica mejorada, basada en LC-MS/MS QqQ previa derivatización con FMOC, para determinación de residuos del herbicida glifosato y su principal metabolito AMPA en suelos de Latinoamérica (Colombia y Argentina), en donde este herbicida es usado ampliamente. Este tipo de suelos, generalmente con alto contenido de materia orgánica, presenta gran dificultad en el análisis de glifosato y AMPA, con un fuerte efecto matriz (drástica supresión de la ionización), por lo que el objetivo principal del trabajo será minimizar y corregir dicho efecto matriz mediante una combinación de factores, entre los que se incluye la aplicación de una etapa de *clean-up* mediante SPE.

6. Estudiar la posibilidad de determinar directamente residuos de glifosato mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) seguida de MS/MS, como una alternativa a la derivatización con FOMC seguida de cromatografía en fase inversa con columnas C₁₈. Encontrar las condiciones adecuadas de separación cromatográfica con diversas columnas desarrolladas para compuestos polares con mecanismos HILIC o similares. Desarrollar un método analítico directo, basado en LC-MS/MS, para residuos de glifosato en diversos productos vegetales (con especial atención a cereales y soja) que se pueda aplicar para el control de MRL en estos productos.
7. Validar la metodología analítica desarrollada para glifosato en suelos y en vegetales, siguiendo las guías SANCO de la EU, y aplicarla a muestras de suelos latinoamericanos (derivatización con FMOC) y de vegetales (método directo, sin derivatización), incluyendo el análisis de muestras control de calidad (QC), con el fin de comprobar la fiabilidad y robustez de los métodos. Usar criterios rigurosos para confirmar la identidad de los positivos encontrados en las muestras, adquiriendo, al menos, dos transiciones por compuesto y evaluando las relación de intensidades (Q/q ratio).
8. Aplicar metodología analítica basada en cromatografía de ultra presión (UHPLC) acoplada a MS/MS QqQ, desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación, a la determinación de drogas de abuso y metabolitos relevantes en aguas residuales (influyente urbano) de poblaciones españolas (Castellón y Murcia) y colombianas (Bogotá y Medellín), con el fin de determinar los niveles de concentración de estos compuestos. A partir de estos resultados, evaluar la carga diaria de drogas como cocaína, cannabis, anfetaminas y derivados, en las aguas residuales, y estimar el consumo de estas drogas en las poblaciones objeto de estudio siguiendo la aproximación conocida como epidemiología de las aguas residuales (*Sewage-Based Epidemiology, WBE*). Los resultados obtenidos en las poblaciones de Colombia serán los primeros reportados en la literatura sobre el consumo de drogas en este país mediante la aproximación WBE.

Objectives

The **main objective** of this Thesis is the development, validation and application of modern analytical methodology for pesticide residue analysis in environmental and food samples. To this aim, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with triple quadrupole analyser (QqQ) has been used. The work has been focused on sample collected from Latino America, specifically from Colombia and Argentina.

The **specific objectives** have been the following:

1. To develop multi-residue analytical methods based on LC-MS/MS QqQ for the determination of pesticides of wide use in Colombia, as well as their metabolites, in tropical fruits from this Country (uchuva, maracuyá, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya, granadilla, lulo, carambolo, feijoa, mangostán y guayaba). The purpose is to offer new analytical information on this type of fruits, for which very little methods have been reported, and to help in the future monitoring of pesticide residues in the products consumed in Colombia as well those exported to other Countries, with special attention to the EU. Sample treatments applied will be simple, easy to implement in routine laboratories, avoiding sample manipulation as much as possible. To this aim, solid-liquid extraction with Ultraturrax and the QuEChERS procedure will be applied.
2. To perform a detailed study on matrix effects for the tropical fruits under study, and suggest possible solutions for their appropriate correction. As the use of ILIS is problematic in multi-residue methods, other alternative simple solutions, although efficient, will be proposed based on the indirect application of calibration in matrix: either by application of correction factors resulting from the differences in slopes of

calibration in solvent and in matrix, or by selection of representative matrices to perform the calibration.

3. To develop multi-residue analytical methodology based on LC-MS/MS QqQ for pesticide residues in soils from Argentina. To test the applicability and robustness in a notable number of soils of very different physico-chemical characteristics, with the final objective of implementing this methodology in the *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*, Balcarce (Argentina). This methodology will be developed for selected pesticides of wide use in Argentina.
4. To validate the multi-residue analytical methodology developed in this Thesis accordingly to the European SANCO guidelines. To apply that methodology to soils and tropical fruits from Latino América including quality control samples (QCs) in every sequence of analysis in order to demonstrate the reliability and robustness of the methods. To apply strict criteria for confirmation of the identity of the compounds detected in samples, by acquisition of, at least, two MS/MS transitions per compound and by evaluating the Q/q ion ratio.
5. To develop improved analytical methodology, based on LC-MS/MS previous derivatization with FMOC, for residue determination of the herbicide glyphosate and its major metabolite AMPA in soils from Latino América (Colombia, Argentina), where this herbicide is widely applied. These soils commonly have high organic matter content and present great difficulties for glyphosate and AMPA residue determination, with strong matrix effects (drastic ionization suppression). Thus, the main objective of this work was to minimize and correct the strong matrix effect observed by including a clean-up step based on SPE.

6. To investigate the possibility to perform direct determination of glyphosate by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) followed by MS/MS as an alternative to the derivatization with FMOc and by reversed phase-LC with C₁₈ columns. To find the appropriate conditions for the chromatographic separation with several columns developed for polar compounds with HILIC mechanisms or similar. To develop a direct LC-MS/MS method for glyphosate residues in vegetables (cereals and soya), which can be applied for monitoring the compliance of the maximum residue limits in these products.
7. To validate the analytical methodology developed for glyphosate in soils and vegetables following the EU SANCO guidelines. To apply that methodology to soil samples from Latino América (derivatization with FMOc) and to vegetable samples (direct method, without derivatization), including Quality Control samples to demonstrate the reliability and robustness of the methods. To apply strict criteria for confirmation of the identity of positive findings in samples by acquisition of, at least, two MS/MS transitions and evaluation of the ion intensity ratios.
8. To apply the UHPLC-MS/MS QqQ analytical methodology developed by our research group to the determination of illicit drugs and metabolites in urban waste waters from Spanish (Castellon, Murcia) and Colombian (Bogotá, Medellin) towns in order to know their concentrations in the samples analyzed. From the raw data obtained, to evaluate the daily loads of commonly consumed drugs as cocaine, cannabis, amphetamines and amphetamines type stimulants, in influent wastewaters and to estimate the consumption of these drugs in the populations under study following the approach known as *Sewage-Based Epidemiology (SBE)* or also as *Wastewater-Based Epidemiology (WBE)*. The results obtained for the populations from Colombia will be the first data reported in the literature on estimation of drugs consumption in that Country following the WBE approach.

Capítulo 1

Introducción general



1. Determinación de residuos de plaguicidas en muestras de interés ambiental y alimentario

1.1. Problemática general

El uso de plaguicidas en la agricultura constituye el procedimiento habitual más eficaz de lucha contra las plagas. Se trata de sustancias, generalmente de origen sintético, con estructuras y propiedades físico-químicas muy diversas. Aunque cada vez existen más productos de origen natural (ej. extraídos de los propios vegetales), cuya toxicidad es más limitada, la mayoría de plaguicidas usados en la actualidad tienen un cierto carácter nocivo/tóxico y, pueden llegar a causar daños a los seres humanos, animales o al medio ambiente, ya que están diseñados para matar o afectar negativamente a los organismos diana que son objeto de su acción. Sin embargo, bajo un uso correcto, estos compuestos químicos son muy útiles y eficaces, formando parte fundamental de la agricultura porque permiten proteger a los cultivos del ataque de plagas muy diversas, del brote de ciertas enfermedades y aparición de malezas (EPA, 2014). Dentro del grupo de plaguicidas también se incluyen sustancias usadas como reguladoras del crecimiento de plantas, exfoliantes, desencantes, y las aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante su almacenamiento y transporte (Econ, 2013; FAO, 2010).

Los plaguicidas se aplican en presencia de aditivos como formulados comerciales, obtenidos tras procesos de fabricación muy variados, existiendo formulados en estado sólido, líquido o gaseoso. Por ello, los formulados aplicados en el campo están compuestos, generalmente, por el ingrediente activo (sustancia responsable del efecto biológico del plaguicida) y por aditivos (sustancias agregadas a los ingredientes activos para facilitar la aplicación, mejorar su acción frente a las plagas y evitar su descomposición). Se subdividen en diferentes grupos en función

de las plagas que controlan, siendo los más importantes, por su mayor uso, los insecticidas, herbicidas, bactericidas, fungicidas y acaricidas (Elika, 2011).

El amplio uso de plaguicidas en las actividades agrícolas, junto a su toxicidad (muy variable según el tipo de plaguicida), y su persistencia (también altamente variable según la estructura química), hace que estos compuestos, así como sus metabolitos y productos de transformación (TPs), puedan estar presentes en suelos, aguas, atmósfera y alimentos, considerándose una de las problemáticas ambientales más importantes en la actualidad. En este sentido, existen numerosos estudios que evidencian que el uso agrícola de plaguicidas tiene importantes efectos sobre la calidad del agua, pudiendo tener serias consecuencias ambientales. Desafortunadamente, los evidentes beneficios aportados por estos productos agroquímicos (asegurar las necesidades alimentarias a nivel mundial, aumentar la producción, evitar enfermedades transmitidas por insectos, hongos y bacterias, ...) suelen ir acompañados de una serie de perjuicios, muchos de ellos sobre importantes ecosistemas, como consecuencia de la perturbación de las relaciones depredador-presa y de la pérdida de biodiversidad. Muchos de los efectos negativos de los plaguicidas suelen ser consecuencia de un uso incorrecto, bien porque se superan las dosis máximas recomendadas, no se respetan los plazos de seguridad, o porque se utilizan productos que no están permitidos.

Con el convenio de Estocolmo, aprobado en 2004, algunos de los plaguicidas más utilizados hasta entonces, que en su día se caracterizaron por su alta eficacia, facilidad de aplicación y viabilidad económica, fueron retirados debido a los graves daños causados al medio ambiente y a la salud humana, principalmente por su elevada persistencia. Se trata de compuestos organoclorados, como aldrín, clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y toxafeno (Bogdal, 2013).

Bajo la filosofía de preservar la Seguridad Alimentaria, la EPA prohibió el uso de algunos plaguicidas carbamatos (carbofuran, aldicarb, metomilo, oxamilo, imidacloprid, formetanato HCl), organofosforados (metamidofos, paration metil, acefato), y casi la totalidad de organoclorados, en el periodo comprendido entre 2009-2013 (EPA, 2014). Cabe destacar que a nivel Europeo (Regulation EC/1107/2009) estos compuestos también tienen prohibida su venta y comercialización, como otros más objeto de estudio en esta tesis, pero que aún están vigentes en países Latinoamericanos (por ejemplo, Colombia). En el capítulo 2 se estudian algunos de estos compuestos.

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la encargada de vigilar los problemas de seguridad alimentaria asociados al uso de plaguicidas. Esta agencia efectúa las recomendaciones pertinentes sobre problemas toxicológicos y ambientales, riesgos asociados, definiciones de residuos en alimentos, etc (EFSA, 2015). Por otro lado, el registro y comercialización de productos fitosanitarios viene regulado por la Directiva 91/414/EEC, posteriormente derogada por la Regulation EC/1107/2009. Con la implantación de esta directiva se produjo una importante re-estructuración en el uso de plaguicidas en la agricultura europea, y supuso la retirada paulatina de cientos de plaguicidas, muchos de ellos, ampliamente usados hasta entonces.

La Directiva 91/414 establece normas uniformes en materia de evaluación, autorización, comercialización y control dentro de la Unión Europea (UE) de los productos fitosanitarios y de las sustancias activas que contienen. Únicamente están autorizados los fitosanitarios cuyas sustancias activas figuren en la lista del Anexo I de la Directiva que, si se utilizan bajo las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) no presentan riesgos para la salud humana o animal ni para el medio ambiente. En la Directiva se especifican los requisitos de la documentación que debe presentarse para solicitar la inclusión de una sustancia activa en la lista de las sustancias autorizadas (Anexo II), así como los requisitos para solicitar la autorización de un producto fitosanitario (Anexo III). Estas condiciones se refieren, en particular, a la identificación de la sustancia o del producto, a la identidad del productor y del solicitante de la autorización, a la realización de ensayos y de análisis por servicios u organismos de ensayos oficiales o reconocidos oficialmente, etc... En lo que respecta a las sustancias activas actualmente comercializadas, la Directiva prevé un programa de evaluación de dichas sustancias escalonado en doce años a partir de la entrada en vigor de la misma. Dicho programa se prorrogó hasta marzo de 2009. Desde finales de 2003, las cuestiones de evaluación de los riesgos son tratadas por la EFSA, mientras que la Comisión sigue siendo competente para adoptar la decisión en materia de gestión del riesgo (Europa, 2015).

La venta mundial de plaguicidas, según datos de 2013, fue de aproximadamente 60.689 billones de dólares, siendo los más vendidos los insecticidas, herbicidas y fungicidas (Statista, 2015). Se estima que para 2017 la industria agroquímica aumentará sus ventas alrededor del 5 %, siendo los países de América del Sur (Brasil y Argentina, principalmente) y de Asia los de mayor crecimiento en consumo de estos productos (Wcropchemicals, 2013).

Debido a las posibles consecuencias negativas de los plaguicidas sobre la salud humana y animal y sobre el medio ambiente, se ha avanzado cada vez más en el desarrollo de nuevos compuestos que produzcan el menor daño posible y que puedan degradarse más rápidamente en el medio ambiente, minimizando así su persistencia y bioacumulación. De este modo, plaguicidas organoclorados y algunos de los fosforados se han ido sustituyendo por compuestos de nueva generación, que resultan en general menos tóxicos para los organismos a los que no están destinados, a la vez que se degradan más fácilmente en el medio ambiente (Marín, 2010).

En el caso de productos vegetales, la problemática de los plaguicidas está bien estudiada, en cuanto a la definición de residuo, en la que se incluyen en ocasiones metabolitos relevantes, así como en cuanto a la toxicidad y límites máximos de residuos (MRLs) permitidos. Sin embargo, la problemática ambiental es más desconocida. Una vez que el plaguicida entra en contacto con el medio ambiente suelo-agua, sufre distintos procesos de transformación/degradación originando diversos TP's. Estos TP's se consideran muchas veces como contaminantes emergentes, es decir compuestos que, aunque afectan al medio ambiente, no están todavía regulados (en este grupo se incluyen también los fármacos, drogas de abuso y productos de cuidado personal), y, en ocasiones, no son bien conocidos. Además, algunos TP's pueden ser tan tóxicos, o incluso más, que el propio producto de partida. Esto implica que para conocer el impacto ambiental real del uso de plaguicidas en aguas o suelos sea necesario conocer tanto los niveles de plaguicidas como de sus TP's. Por ello, en programas de control de contaminación por plaguicidas suelen incluirse algunos de los TP's más relevantes. Muchas veces, el descubrimiento/identificación de TP's forma parte de las investigaciones analíticas, ya que no se conoce bien cuáles son los prioritarios en las muestras analizadas. Uno de los inconvenientes en la determinación de TP's es la falta de disponibilidad de patrones de referencia comerciales, lo que dificulta su análisis y hace prácticamente imposible su correcta cuantificación. Otro punto importante es que estas sustancias suelen ser más polares que el compuesto de origen, lo que aumenta los problemas analíticos y dificulta su inclusión en métodos multiresiduo (MRM).

La distribución y destino de los plaguicidas depende de varios factores entre los que se encuentran la naturaleza y dosis de aplicación del compuesto, la degradación con el tiempo, el metabolismo y su conversión en diferentes productos debido a su movimiento de una esfera a la otra a través del ciclo de los plaguicidas, como se ilustra en la **Figura 1.1**. El ciclo de los

residuos de plaguicidas en el medio ambiente empieza con la etapa de aplicación con fines de control de plagas en el campo. Estos residuos pueden llegar a cada componente del medio ambiente, incluyendo comida (granos, frutas, verduras y otros cultivos), animales y productos animales, aguas (superficiales y subterráneas), animales acuáticos, aire y suelo (Kailasa, 2013).

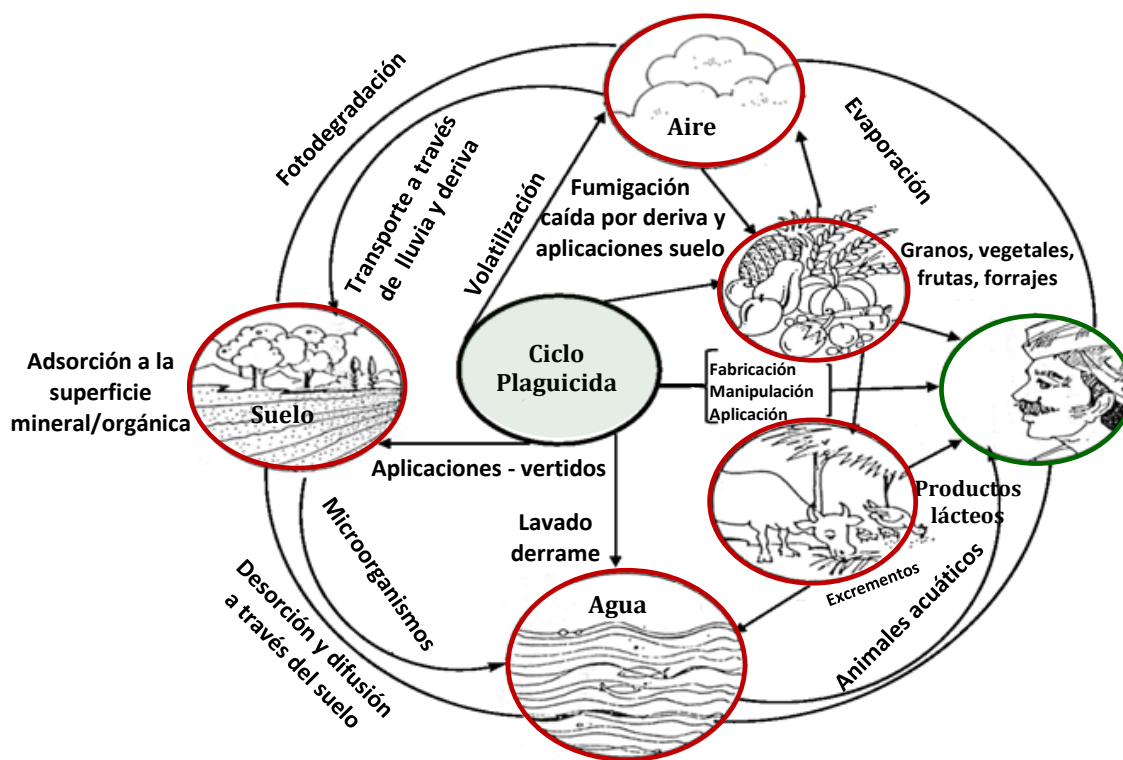


Figura 1.1 Distribución de los plaguicidas en el medio ambiente (Kailasa, 2013).

En cuanto a la determinación de residuos de plaguicidas, es importante aclarar que no existen métodos universales de análisis capaces de detectar todos los compuestos que, potencialmente, podrían estar presentes en una muestra, debido a la extraordinaria variedad en las propiedades físico-químicas de los plaguicidas y metabolitos/TPs, con amplios rangos de polaridad, carácter iónico (especies aniónicas, catiónicas y neutras) y volatilidad. Esto hace prácticamente imposible que puedan ser incluidos dentro de un mismo método analítico o tratamiento de muestra compuestos de baja y alta polaridad, y/o baja y alta volatilidad.

Es fundamental escoger y adaptar la metodología analítica para que puedan ser incluidos los compuestos prioritarios y los más utilizados en la zona o muestras objeto de estudio. Por ello, una labor muy importante antes de los análisis en un programa de control ambiental o bien de seguridad alimentaria es la selección de los compuestos incluidos en la metodología aplicada. Por ejemplo, en programas de control en aguas, esta selección debería hacerse en base al grado de utilización de los compuestos en las actividades agrícolas del entorno, de la toxicidad de los plaguicidas, su persistencia (por ejemplo, frente a la hidrólisis y fotodegradación), incluyendo también compuestos (tanto plaguicidas como TPs) que se hayan detectado en análisis anteriores de la zona. Generalmente, será necesario aplicar MRM complementarios basados en el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), por un lado, y de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), por otro, con el fin de abarcar el mayor número posible de compuestos. A pesar de esta complementariedad, para ciertos plaguicidas se requieren métodos individuales, ya que no pueden ser incluidos fácilmente en los MRM, como ocurre con el glifosato, compuesto estudiado en esta tesis y de primordial interés a nivel mundial, los herbicidas de la familia de los quats, el fosetil, o el etefon, entre otros.

Actualmente, el análisis de residuos de plaguicidas (ARP) no se puede entender sin el uso del acoplamiento cromatografía/ espectrometría de masas (MS), por su gran potencial identificativo y detección universal. La combinación GC-MS/MS y LC-MS/MS con analizadores de triple cuadrupolo, se muestra hoy en día como el enfoque más eficaz para la determinación de todo tipo de compuestos, desde los no polares/volátiles a compuestos polares/no volátiles. La tendencia hacia el predominio de LC-MS/MS es cada vez más evidente, por su mayor versatilidad y aplicabilidad a los plaguicidas actualmente utilizados (de polaridad media-alta), así como a sus metabolitos/TPs (Alder, 2006; Botitsi, 2011; Núñez, 2012; Soler, 2008).

1.1.2 Límites máximos de residuos de plaguicidas

La seguridad alimentaria debe ser una de las líneas prioritarias de actuación de las administraciones públicas, con el fin de preservar la salud de los consumidores. A pesar de que la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos está estrictamente regulada y existe numerosa legislación internacional al respecto, surgen periódicamente casos de alertas

alimentarias relacionadas con plaguicidas en todo el mundo. Generalmente, estas alertas son consecuencia de la presencia de sustancias prohibidas en los alimentos, que suelen ser plaguicidas que ya se han retirado o compuestos cuyo uso no está registrado. Además, en ocasiones se superan los MRLs, lo cual supone un problema legal ya que el alimento no se puede comercializar, aunque no necesariamente implique un riesgo para la salud.

Los MRLs son las máximas concentraciones permitidas de residuos del ingrediente activo de un plaguicida y/o sus metabolitos (en función de la definición de residuo) en un producto agrícola, expresada en miligramos de sustancia activa por kilogramo de producto (mg/kg). Se establecen con el fin de preservar la salud de los consumidores y están basados en la combinación de datos agronómicos, obtenidos en ensayos de residuos de plaguicidas, y de datos toxicológicos.

Los MRLs se fijan en el proceso de autorización de una materia activa y son de obligado cumplimiento legal, es decir, todo alimento vegetal o animal que supere el valor del MRL para uno o más plaguicidas debe ser retirado y no puede comercializarse. Para establecer los MRLs son necesarios ensayos de residuos que deben llevarse a cabo en cumplimiento con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BLP) (*Good Laboratory Practices, GLP*), aplicando Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) (*Good Agricultural Practices, GAP*). Estos estudios BPL constan de dos fases: 1) fase de campo, en la que se aplica el formulado correspondiente conteniendo la materia activa objeto de regulación, a las dosis máximas recomendadas, intentando simular el peor caso posible en cuanto a aplicación del plaguicida; 2) fase de laboratorio, en donde se lleva a cabo el estudio analítico (validación del método y análisis de residuos en las muestras procedentes de la fase de campo) obteniendo las concentraciones del plaguicida de acuerdo a la definición de residuo previamente aceptada (en algunos casos, puede incluir uno o más metabolitos). Con los datos de residuos que realmente se encuentran en las muestras de campo, en las condiciones indicadas, se fija finalmente el valor del MRL, estableciendo un cierto margen de seguridad con el fin de que no se vea superado en el futuro si se siguen las BPA. En este proceso, se debe asegurar que los residuos que quedan en los alimentos no llegan a ser tóxicos para los seres humanos, para lo cual se usan los datos aportados en estudios BPL sobre toxicidad (principalmente la ingesta diaria admisible).

Durante muchos años, los MRLs no han estado armonizados a nivel internacional, con lo que muchas veces cada país disponía de sus propios MRLs. Este hecho dificultaba el comercio

internacional y suponía enormes trabas en la exportación de alimentos vegetales, pues había que trabajar los cultivos prácticamente “a la carta”, aplicando dosis y productos fitosanitarios en función del país al que iban a estar destinados los alimentos. Esta situación era especialmente llamativa dentro de Europa, donde muchos países tenían MRLs diferentes a otros. A partir de la Directiva 91/414/EEC se empezó a trabajar en la armonización europea, y con el Reglamento (EC) 396/2005 (European Union Decision, 2005) se establecieron finalmente los MRLs europeos para plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Todas las sustancias activas presentes en un producto fitosanitario deben someterse a una evaluación, con el fin de determinar el umbral límite por encima del cual su concentración en los productos alimenticios puede plantear un riesgo para las personas o los animales. Una vez realizada esta evaluación, la Directiva 91/414/EEC, que regula la comercialización de productos fitosanitarios en Europa, permite su comercialización. La promulgación de esta Directiva ha dado lugar a un complejo proceso de re-evaluación de productos comercializados con anterioridad, cuyo resultado final ha sido la retirada de numerosos plaguicidas, algunos de ellos de amplia utilización en la agricultura mundial.

Aunque la situación para el comercio internacional ha mejorado gracias a la armonización de MRLs en Europa, todavía existen discrepancias entre algunos países no europeos. Además, las tendencias actuales de los mercados se dirigen hacia el consumo de alimentos con muy bajos contenidos de plaguicidas o incluso con total ausencia de residuos. Esto hace necesario que los agroexportadores necesiten información actualizada sobre las exigencias de los países importadores en cuanto a la normativa sobre MRLs de plaguicidas, así como exigencias adicionales de ciertas cadenas importantes de hipermercados, que a veces establecen sus “propios MRLs” con valores inferiores a los oficiales.

A nivel mundial, la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Comisión del Codex Alimentarius, proponen sus propios MRLs con el fin de promover su armonización y facilitar el comercio internacional de alimentos. Estas normas han adquirido especial importancia en el contexto internacional debido a su reconocimiento dentro del Acuerdo de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial de Comercio (OMC). Sin embargo, muchas veces los MRLs del Codex no coinciden con los de la UE, con lo que el comercio internacional de productos vegetales sigue teniendo dificultades asociadas a la presencia de residuos de plaguicidas.

Colombia, como la mayoría de países latinoamericanos, ha adoptado como estándares nacionales los MRLs del CODEX. Pero para que Colombia pueda exportar sus apreciadas frutas tropicales debe adaptarse a la reglamentación que cada país propone. Tal es el caso de los Estados Unidos, que cuenta con sus propios MRLs propuestos por el Departamento de Agricultura (USDA), o de la Unión Europea (EU) por medio del Reglamento (EC)/396/2005 de la Comisión Europea, que fija las cantidades máximas autorizadas de residuos de plaguicidas en los productos destinados al consumo humano o animal. Como se ha indicado anteriormente, se establecen MRLs sobre la base de estudios BPL. Cuando la materia activa está autorizada, pero no se han hecho los correspondientes estudios de residuos para un cierto cultivo, se establece un MRL por defecto, que corresponde al límite de determinación (cuantificación) del método analítico, que suele estar fijado normalmente entre 0.01 y 0.05 mg/kg. De esta manera se garantiza, por un lado, la libre circulación de alimentos y piensos y la igualdad de condiciones en la competencia y, por otro lado, un nivel elevado de protección a los consumidores.

En el Anexo I del Reglamento (EC)/396/2005 (European Union Decision, 2005) aparece la clasificación de los alimentos a los que se les aplican los MRLs. Su clasificación se lleva a cabo teniendo en cuenta matrices con características similares estableciéndose 12 grupos. En este punto cabe resaltar que algunas frutas tropicales o exóticas no figuran en este Anexo, así que su clasificación se realizó por su nombre científico o familias, como se comentará en el capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral.

Por su parte, la EFSA debe pronunciarse para cada nuevo MRL y cada modificación o supresión previstas (salvo supresión por causa de revocación de una autorización aplicable a un producto fitosanitario). Propone posibles modificaciones en la definición de residuo, indica cuál es el límite de determinación previsto para una combinación plaguicida/producto en el caso de que no haya una propuesta de MRL, y realiza una evaluación de los riesgos en caso de que se supere la dosis diaria admisible. A partir de los dictámenes de la EFSA, la Comisión elabora un reglamento que modifica o suprime un MRL ya existente Reglamento (CE)/396/2005 (European Union Decision, 2005).

Para vigilar el cumplimiento de los MRLs, es necesario realizar análisis periódicos de los alimentos de consumo humano. Esta labor la realizan laboratorios designados para el control oficial de residuos de plaguicidas, que deben aplicar métodos analíticos fiables que hayan

sido validados con anterioridad. Estos laboratorios deben estar acreditados bajo la norma ISO 17025. Además, deben basarse en la guía SANCO vigente sobre validación de los métodos y requisitos del control de calidad para poder dar validez a los datos reportados en los controles oficiales de residuos de plaguicidas usados con el fin de comprobar el cumplimiento de los MRLs, con fines legales, y para evaluar la exposición de los consumidores a los plaguicidas. Otro documento complementario es la guía SANCO/825/00, que trata sobre los requerimientos que deben cumplir los métodos analíticos usados en análisis de residuos de plaguicidas para el control post-registro.

Cabe señalar que se observa una tendencia hacia una mayor complicación analítica, con tratamientos de muestra más complejos (por ejemplo, incluyendo etapas de hidrólisis), como consecuencia de las revisiones en las definiciones de residuo en las que se incluyen metabolitos relevantes (muchas veces, conjugados) que antes no se contemplaban. Posiblemente, en el futuro próximo, se producirán modificaciones importantes en ARP en el sentido de incluir etapas de hidrólisis para un buen número de plaguicidas.

1.1.3. Tratamiento de muestra

En el proceso de ARP se pueden distinguir una serie de etapas, ya que rara vez se puede realizar el análisis directamente sobre la muestra. Normalmente, es necesario aislar los analitos de la matriz de la muestra, seguido de una etapa de concentración con el fin de facilitar la determinación a los bajos niveles (sub-ppm y sub-ppb) en que se encuentran los plaguicidas en las muestras. Estas etapas dependen en gran medida del tipo de muestra (suelos, aguas, alimentos, sedimentos), del analito en cuestión, y de la técnica de medida usada (normalmente, GC-MS y LC-MS).

Evidentemente, la muestra a analizar debe ser homogénea y representativa, lo cual constituye un requisito previo antes de realizar cualquier análisis. Las etapas más habituales en ARP incluyen los diversos procesos seguidos en el tratamiento de muestra, generalmente consistente en una extracción, seguida de purificación (clean up) y pre-concentración. Finalmente, la medida se lleva a cabo mediante LC-MS y/o GC-MS. En ocasiones, es necesaria una etapa de derivatización para hacer posible o facilitar la determinación del analito mediante la técnica utilizada.

A continuación, se comentan brevemente estas etapas, las cuales pueden ser aplicadas en su totalidad, puede suprimirse alguna de ellas, o bien pueden combinarse varias en una sola. Esto depende de la combinación analito/matriz y de la técnica utilizada.

a) Etapa de extracción

La extracción convencional de los analitos en la muestra se suele hacer mediante extracción solido-liquido (SLE), en el caso de matrices sólidas, utilizando disolventes orgánicos apropiados. El disolvente se escoge en función de la polaridad de los analitos y de la naturaleza de la matriz a estudiar. Entre los más usados se encuentran el metanol (MeOH), la acetona (ACT), el acetato de etilo (AcEt) y el acetonitrilo (ACN). Las extracciones se pueden llevar a cabo de forma manual, con agitación, o de forma automatizada. Se suelen usar asimismo diversos sistemas para aumentar la eficiencia de la extracción, que van desde la simple maceración, agitación mecánica o trituración con Ultraturrax, hasta las extracciones mejoradas mediante ultrasonidos, microondas, alta temperatura (ej. soxhlet) o alta presión (ej. extracción acelerada con disolventes; ASE), entre otros sistemas. Otras opciones que se han usado en ARP para la extracción de muestras sólidas son la micro extracción liquido-liquido dispersiva (DLLME), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la termodesorción (TD).

En el caso de muestras líquidas (por ejemplo, aguas, leche, orinas,...), también se ha usado la extracción con disolventes, mediante partición liquido-liquido (LLE). Pero, sin duda, el procedimiento más habitual en la actualidad, sobretodo en el caso de aguas, es la extracción en fase sólida (SPE), pasando la muestra a través de un sorbente contenido en un cartucho. El objetivo es que los analitos queden retenidos en el cartucho mientras que la muestra pasa a través del mismo. Una posterior elución con un disolvente adecuado permitirá recuperar los analitos, generalmente en un volumen considerablemente menor que el de muestra pasado por SPE, con lo que además de la separación del analito se consigue también una importante pre-concentración.

La microextracción en fase solida (SPME) está ganando cada vez más popularidad para extraer matrices liquidas en general, tanto en su modalidad de inmersión directa, como en su modalidad de *head-space* o espacio de cabeza (HS-SPME) para la extracción de compuestos volátiles. También se puede usar en matrices sólidas, pero suele ser necesario aplicar antes una extracción en medio acuoso o con bajo contenido de disolvente orgánico, a no ser que se

trate de la extracción de volátiles mediante HS-SPME, en cuyo caso se puede realizar directamente sobre la muestra sólida, previamente homogenizada. Típicamente, la SPME se aplica en combinación con GC por la facilidad que supone la desorción térmica directamente en el GC, aunque se han reportado algunas aplicaciones para LC.

Existen numerosos antecedentes en la bibliografía sobre los distintos sistemas de extracción aplicados en ARP. Otros procedimientos, menos utilizados, son *Stir-Bar Sorptive Extraction* (SBSE), donde se utilizan agitadores magnéticos recubiertos de sorbente que aportan una mayor superficie de contacto, o aquellas metodologías que hacen uso de pocos microlitros de disolvente como fase aceptora de los analitos (*Liquid Phase Microextraction* (LPME)), de una gota de solvente como aceptor (*Single-drop microextraction* (SDME)), o de membranas capilares de fibra hueca como soporte de la fase aceptora (*Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction* (HF-LPME)). A continuación, se indican algunos artículos interesantes, que se pueden consultar sobre este tema (Ahmadi, 2015; Fenoll, 2009; Fabregat-Cabello, 2014; Liang, 2013; Net, 2015; Tadeo, 2012; Zanella, 2012).

b) Purificación y/o pre-concentración del extracto

Una de las dificultades que se presentan en ARP y en la determinación de contaminantes orgánicos en general, a nivel de residuos, es la gran cantidad de compuestos presentes en la matriz, muchos de ellos mayoritarios, que pueden ser con-extraídos junto con los analitos en la etapa de extracción, produciendo interferencias en los análisis. Es frecuente aplicar alguna etapa de purificación o *clean-up* de los extractos obtenidos, por varias razones:

- Eliminar, en lo posible, la mayor cantidad de interferentes de la matriz que puedan afectar negativamente en la posterior medida de los analitos, tanto en la etapa de separación cromatográfica como en la de detección.
- Beneficiar el sistema instrumental utilizado para la separación-detección de los analitos, ya que la presencia de ciertos componentes de la matriz puede afectar de modo negativo a la vida de la columna cromatográfica, y ensuciar los componentes del equipo de medida (ej. *glass liner*, detector, sistema de detección, etc) influyendo en el correcto funcionamiento de dicho sistema instrumental.
- Mejorar los límites de detección y de cuantificación del método, pues al trabajar con extractos más limpios se facilita la disminución del efecto matriz (muy frecuente

cuando se usan interfases a presión atmosférica) y del ruido de fondo, por lo que la relación señal/ruido (S/N) aumenta, pudiendo alcanzar niveles de concentración más bajos.

Una de las técnicas de preparación de muestra más usadas para la purificación y/o pre concentración de plaguicidas en ARP es la SPE. Esta técnica no sólo se puede usar para la extracción inicial de los analitos (por ejemplo, en una muestra de agua), sino también para la purificación de extractos obtenidos después de la extracción con un disolvente. Actualmente, existe una gran variedad de rellenos que pueden usarse como fase estacionaria en un procedimiento SPE, pudiendo escoger el más adecuado para cada aplicación, en función de las características de los analitos y de la matriz de la muestra. Entre los más usados se encuentran los más populares de sílice enlazada (tipo C₁₈), los poliméricos (ej. Oasis HLB, Chromabond-RP,...), y los de intercambio aniónico y catiónico, tanto fuerte como débil (ej. Oasis MCX, SAX, WAX, MAX y WCX).

Aunque la etapa de purificación conlleva claras ventajas, sin embargo también presenta inconvenientes, como el tiempo y reactivos que se consumen y especialmente la mayor manipulación de muestra, lo cual aumenta las posibilidades de que se produzcan errores por pérdida del analito o por contaminación. Además, cuando se aplican etapas de purificación se disminuye normalmente la universalidad del método, ya que algunos analitos pueden perderse en algunas de las etapas aplicadas. La tendencia actual en la química analítica moderna es la minimización del tratamiento de muestra, intentando, en la medida de lo posible, aplicar métodos basados en la extracción e inyección directa del extracto en el sistema instrumental. Esto es posible gracias a los grandes avances instrumentales y al uso de equipos de MS cada vez más sensibles y con mayor robustez.

A lo largo del tratamiento de muestra es frecuente aplicar alguna etapa de preconcentración, bien del extracto original o bien del extracto purificado. Esto se suele llevar a cabo mediante evaporación controlada, normalmente bajo corriente de nitrógeno, o a vacío, con el fin de rebajar la temperatura y evitar pérdidas de analitos por volatilización.

Como ya se ha indicado antes, el enfoque actual en el desarrollo de MRM consiste en la aplicación de tratamientos de muestras más simples y universales que permiten la determinación de un gran número de compuestos con diferentes características fisicoquímicas. El uso de grandes cantidades de disolventes no es recomendable debido a los

altos costos, el peligro para el analista y los problemas ambientales generados por los desechos de laboratorio.

En los últimos años, se ha hecho muy popular en ARP el procedimiento conocido como QuEChERS que se caracteriza por ser rápido, sencillo, efectivo, robusto y seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Se emplea una extracción simple con ACN y una partición simultánea con sales anhidras, seguida por una limpieza empleando adsorbentes comúnmente usados en SPE a través de una versión “dispersiva” (d-SPE) (Kittlaus, 2013). Este procedimiento fue introducido por Anastassiades y Lehotay (Anastassiades, 2003) como un nuevo enfoque para extraer plaguicidas de un amplio rango de polaridades en distintas matrices de alimentos. El procedimiento base consiste en el uso de ACN para la extracción, seguido de la adición de MgSO_4 anhidro y NaCl para la eliminación del agua. Posteriormente, se usa amina primaria/secundaria (PSA) para el clean-up mediante d-SPE. La versión original, que no usaba ningún tipo de buffer, ha sido modificada en varias ocasiones (Lehotay, 2010). En la actualidad existen dos versiones de QuEChERS, que son métodos de referencia en ARP, que surgen como consecuencia de mejoras para la extracción de ciertos plaguicidas (especialmente aquellos cuya eficacia en la extracción depende del pH) y para matrices más complejas.

Esta mejora del método original ha sido promovida por ambos autores, y constituyen las dos versiones más populares: a) el método oficial de la AOAC, 2007.01, que utiliza buffer concentrado de acetato, de pH 4.8 (Lehotay, 2007); b) el método del Comité Europeo de Normalización (CEN) Método Estándar EN 15662, que utiliza buffer más débil de citrato, de pH 5-5.5 promovido por Anastassiades (CEN, 2008). Con ambas modificaciones, se consiguen mejores recuperaciones y más consistentes que con la versión original no tamponada para plaguicidas dependientes del pH, como clorotalonil, folpet, tolylfluanid o pymetrozine. Se han realizado varios estudios comparativos entre las tres versiones que aportan información relevante sobre sus similitudes y diferencias (Lehotay, 2010).

Por otro lado, se han utilizado diferentes reactivos para mejorar el *clean-up* mediante d-SPE aparte del PSA usado originalmente en el procedimiento QuEChERS, con el fin de eliminar diferentes ácidos orgánicos polares, pigmentos polares, algunos azúcares y ácidos grasos. Así, se han utilizado otros adsorbentes como Graphited Carbon Black GCB (eliminación de esteroides y pigmentos, como la clorofila), C_{18} (eliminación de interferentes no polares, como

lípidos), Florisil (mejorar la eliminación de compuestos polares), (Chung, 2010; Lehotay, 2005a, 2005b, 2007; Payá, 2007).

Cabe citar algunos “reviews” interesantes sobre la aplicación de QuEChERS en los que se discute esta metodología y se presentan las distintas aproximaciones utilizadas, como el realizado por Wilkowska y Biziuk sobre ARP en alimentos (Wilkowska, 2011) o Zanella y colaboradores sobre ARP en cereales y piensos (Zanella, 2012). La metodología QuEChERS también se está aplicando en otros campos distintos al de plaguicidas, como la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en peces (Khorshid, 2015; Nacher-Mestre, 2014), acrilamida en alimentos (Omar, 2015; Weijun, 2015), drogas de uso veterinario en tejidos animales y en leche (Whelan, 2013), fármacos en sangre (Hasegawa, 2015; Sichilongo, 2014) y en órganos animales (Wilkowska, 2011), o micotoxinas en alimentos (Mol, 2008). En el campo ambiental, también ha tenido bastante aceptación, habiéndose aplicado para la extracción de contaminantes clorados en suelos (Pinto, 2010) y en tabaco (Lee, 2008). Recientemente, se han publicado detalladas revisiones sobre la aplicación de QuEChERS en el campo medioambiental (Arias, 2014; Bruzzoniti, 2014; Tadeo, 2012).

A continuación, se presenta un esquema comparativo (**Figura 1.2**) de las modificaciones que ha sufrido este método y de las versiones más conocidas del mismo. Inicialmente, tanto el método de la AOAC como el de la CEN, en el momento de realizar la SPE dispersiva adicionaban la amina primaria/segundaria PSA y MgSO_4 . Esta aproximación de *clean-up* no fue adecuada para compuestos ácidos porque quedaban retenidos en PSA, obteniéndose bajas recuperaciones (ej. picloram, pka 2.3; quinclorac, pka 4.3; 2,4D pka 2.3: dicamba, pka 1.97; sulfonilureas, pka entre 3 y 5). Sin embargo el PSA es un excelente sorbente capaz de eliminar interferentes ácidos que interaccionan fuertemente con los grupos amino de este adsorbente (Arias, 2014).

c) Derivatización

El análisis directo mediante GC o LC para ciertos analitos, usando distintos tipos de detectores, puede resultar complicado si los compuestos interaccionan entre sí o con la columna. Estas interacciones pueden causar una resolución pobre y/o picos asimétricos que dificultan la integración y cuantificación. Además, existen algunos compuestos que no se pueden analizar directamente por la técnica seleccionada porque no cumplen los requisitos exigidos (por ejemplo, suficiente volatilidad y estabilidad térmica en análisis basados en GC).

A veces, los analitos no presentan grupos cromóforos o fluorescentes para ser determinados mediante cromatografía líquida de ultravioleta (LC-UV) o cromatografía líquida con fluorescencia (LC-FD), o presentan una polaridad muy elevada y no pueden retenerse correctamente en la columna de LC utilizada. En todos estos casos, existe la posibilidad de aplicar una etapa previa de derivatización con reactivos químicos adecuados, con el fin de modificar la molécula del analito y así mejorar o hacer posible la separación cromatográfica y/o su detección.

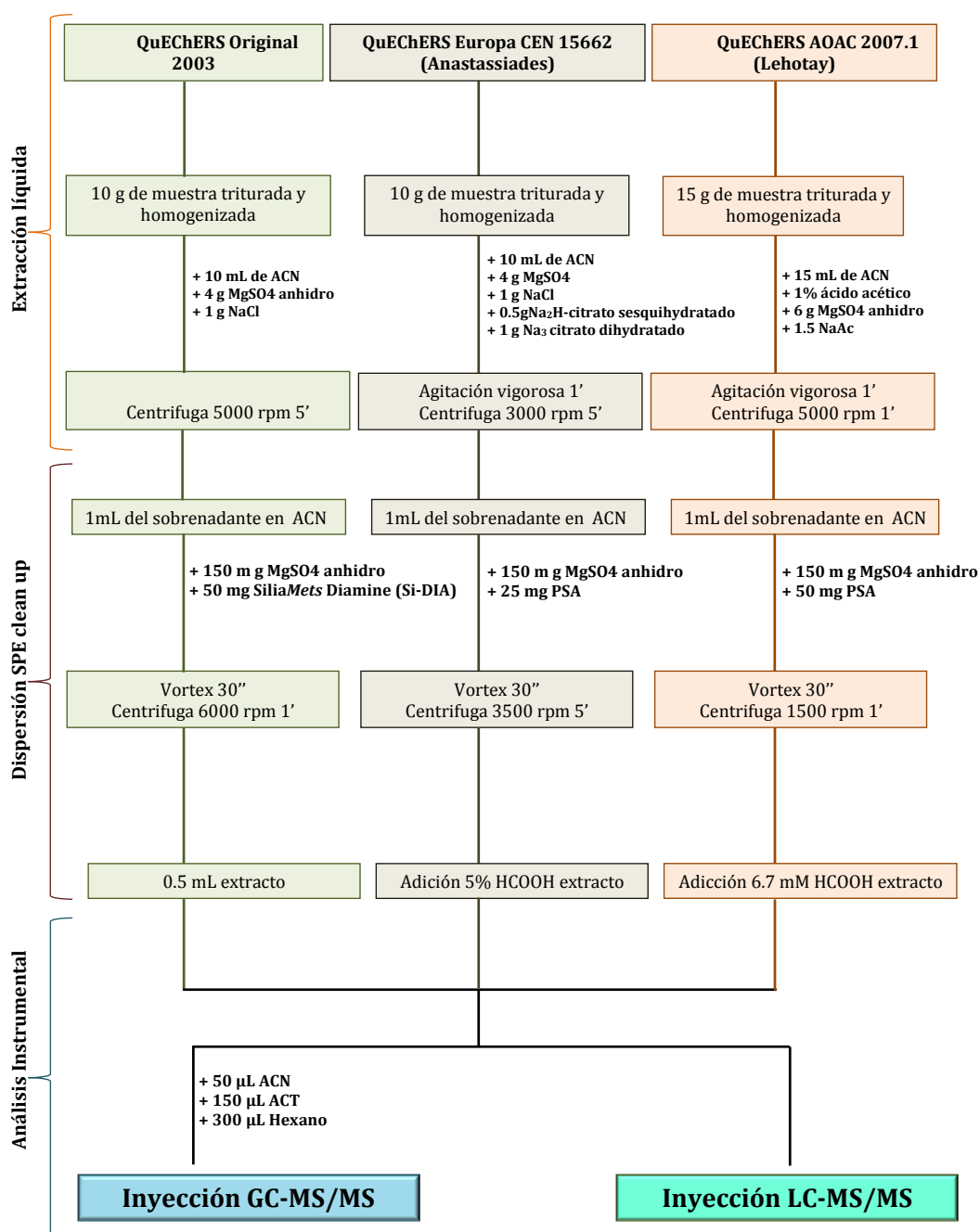


Figura 1.2 Diferentes modificaciones del método de extracción QuEChERS (Anastassiades, 2003; AOAC, 2007; CEN, 2008).

Uno de los casos más conocidos en ARP es la derivatización con FMOC para glifosato y su metabolito AMPA, la cual permite hacerlos compatibles con la determinación por LC-FD (Hernández, 2000; Sancho, 1996a), al tiempo que mejora su retención cromatográfica en columnas C₁₈, facilitando su análisis por técnicas como LC-MS/MS (Ibáñez, 2005, 2006). En la presente Tesis se ha hecho uso de esta reacción para la determinación de residuos de este herbicida en suelos de Latinoamérica.

En general, la derivatización puede también mejorar la selectividad al disminuir las interferencias, cuando los interferentes no reaccionan con el reactivo derivatizante y sólo lo hace el analito. En cualquier caso, se trata de una etapa que puede ser o no necesaria, y que presenta sus ventajas e inconvenientes, derivados estos últimos de la mayor manipulación de muestra, mayor tiempo de análisis y coste de reactivos.

1.1.4.- Medida analítica

Como ya se ha comentado, el ARP no se puede entender sin hacer uso de la cromatografía, tanto GC como LC, con distintos sistemas de detección.

Durante años, los detectores más utilizados en GC fueron los ahora considerados de tipo convencional, como el de captura de electrones (ECD), fotométrico de llama (FPD), o ionización en llama (FID). Actualmente, se impone el acoplamiento GC-MS con analizadores de cuadrupolo (Q) o de trampa de iones (IT). Además, la introducción de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con analizadores de triple cuadrupolo (QqQ), junto con los de IT, ha supuesto un gran avance, permitiendo el desarrollo de métodos más robustos, sensibles, específicos y selectivos. GC-MS/MS con QqQ es una de las mejores técnicas existentes en la actualidad para el desarrollo de MRM para analitos poco polares (compuestos organoclorados (OC), algunos organofosforados (OP), piretroides, etc...) en matrices de tipo alimentario y ambiental. Esta técnica permite la cuantificación e identificación fiable a bajas concentraciones de plaguicidas volátiles pertenecientes a diferentes familias químicas. (Cervera, 2010; Hernández, 2013).

El potencial del acoplamiento GC-MS, o más aún GC-MS/MS, en ARP es indudable. En los últimos años han aparecido nuevas interfaces para GC que producen una ionización suave, como la fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI), que resulta muy adecuada

en métodos de GC-MS/MS. En los espectros de masas producidos en APCI apenas se observa fragmentación, siendo el ión molecular o la molécula protonada $(M+H)^+$ los más abundantes del espectro, a diferencia de los espectros obtenidos en ionización electrónica (EI) caracterizados por una fuerte fragmentación. Esto hace que en GC(APCI)-MS/MS se pueda seleccionar el ion molecular/protonado como ión precursor, abundante y específico, lo cual mejora notablemente la selectividad y sensibilidad del método. Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el desarrollo de métodos GC(APCI)-MS/MS para residuos de plaguicidas. En varios de nuestros trabajos se han mostrado las ventajas de esta técnica en comparación con GC(EI)-MS/MS (Cervera, 2014; Cherta, 2013; Hernández, 2013; Portolés, 2010, 2012, 2014).

Aunque GC-MS/MS es una técnica muy adecuada en ARP, su uso está normalmente limitado a compuestos poco polares y volátiles. Sin embargo, en la actualidad la gran mayoría de plaguicidas utilizados (y especialmente sus metabolitos y TPs), son de naturaleza polar y normalmente poco volátiles, lo que hace que LC sea más adecuada para abordar su determinación. El uso de GC para este tipo de compuestos, generalmente, suele requerir una etapa de derivatización para hacerlos compatibles con el análisis por GC-MS.

Inicialmente, los detectores usados en LC no aportaban información sobre la estructura del compuesto. Se trataba de detectores convencionales como UV-VIS, barrido de diodos (DAD) o fluorescencia. El acoplamiento LC-MS tuvo más dificultades que GC-MS por los problemas que supone la introducción directa de elevados flujos de fase móvil del sistema LC en el detector MS, el cual requiere trabajar en condiciones de alto vacío. En este caso, se hace necesaria una interfase que compatibilice las condiciones físicas (presión, temperatura, etc...) en las que se opera en LC y MS. Este acoplamiento presentó, principalmente, problemas derivados de la falta de afinidad entre el detector de MS con fases móviles no volátiles típicamente usadas en LC convencional, ya que los detectores de masas miden las relaciones masa-carga (m/z) de los analitos ionizados. Tras varios intentos para conseguir una interfase adecuada que pudiese solventar dichos problemas, finalmente, se lograron desarrollar interfases robustas que trabajaran a presión atmosférica (APIs), bien como electrospray (ESI) o en modo de ionización química (APCI). Ambas interfases son las más utilizadas en la actualidad y permiten abordar la determinación de analitos ionizables tanto en modo de ionización negativo como positivo (Botitsi, 2011, Picó, 2006, Soler, 2008).

Una vez superadas las dificultades iniciales, el uso del acoplamiento LC-MS empezó a ser cada vez más popular en el campo de ARP, compitiendo con GC-MS como técnica de referencia e incluso llegándola a desbancar con la implementación de los sistemas LC-MS/MS con analizadores de triple cuadrupolo, tal como se comenta más adelante.

1.1.5.- Validación de métodos analíticos

Para poder garantizar la calidad de los datos reportados por un método analítico y evitar cuantificaciones erróneas y/o falsos positivos o negativos es necesario llevar a cabo una correcta validación del método.

En la EU, en lo referente a validación, son de aplicación las guías SANCO, las cuales definen los criterios que deben cumplir los métodos analíticos desarrollados con fines de control de residuos de plaguicidas y para la vigilancia del cumplimiento de MRLs. Estas guías están en continua revisión, como demuestra el hecho de que en esta Tesis se haya hecho uso de la guía SANCO/10684/2009, la cual, a lo largo del desarrollo de los trabajos, pasó a ser actualizada a la versión SANCO/12571/2013. El cambio más destacable entre ambas versiones, en relación con los métodos analíticos basados en LC-MS/MS, para los que se requieren al menos dos transiciones por analito, radica en las tolerancias permitidas en las desviaciones de la relación q/Q (respuesta transición de confirmación/ respuesta transición cuantificación) entre patrón de referencia y el analito detectado en la muestra, así como en la tolerancia en la desviación en los tiempos de retención. De este tema se hablará con más detalle en el capítulo 3.

Otra guía útil en ARP es la SANCO/825/00, la cual se utilizó en esta Tesis para la metodología desarrollada en suelos. La Decisión/657/CE/2002, referente a métodos analíticos y medidas de control para determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y productos derivados, también fue de utilidad para ciertos aspectos de la validación.

A continuación, siguiendo las recomendaciones SANCO, se exponen brevemente los parámetros analíticos que deben tenerse en cuenta en la validación de un método de ARP:

- Exactitud: se estima mediante ensayos de recuperación para cada analito en la matriz objeto de estudio. Dichos ensayos deben realizarse en muestras fortificadas, como

mínimo a dos concentraciones. Los niveles de fortificación son generalmente el límite de cuantificación del método (LOQ) y 10xLOQ. Para cada nivel, las recuperaciones se calculan como la media de las recuperaciones individuales obtenidas en el análisis de cinco réplicas. Estas recuperaciones se consideran aceptables si la media se encuentra entre el rango 70 -120%. En el caso de matrices complejas, o analitos especialmente problemáticos, se pueden aceptar recuperaciones inferiores siempre que se justifique la dificultad y que la precisión sea buena ($RSD < 20\%$).

- Linealidad: la obtención de un adecuado rango lineal es importante para la adecuada cuantificación de los analitos en la muestra. El rango lineal adecuado es aquel que cubra desde al menos un valor 20% menor del mínimo valor ensayado (LOQ) hasta un 20% mayor que el valor máximo esperado. Se deben inyectar por lo menos de tres a cinco niveles de concentración por duplicado. Para su evaluación se hace uso del coeficiente de correlación, que normalmente debe ser > 0.99 y de los residuales, que deben ser $< \pm 20\%$.
- Precisión: se mide mediante la repetibilidad obtenida en los ensayos de recuperación ($n=5$) y se expresa como la desviación estándar relativa (RSD). Para considerarse satisfactoria, debe ser $\leq 20\%$.
- Límite de detección (LOD): definido como la concentración más baja a la que se puede detectar el analito en la matriz objeto de estudio. Por lo general, se obtiene mediante la relación señal/ruido ($S/N=3$), a partir de un cromatograma de muestra blanco fortificada al nivel más bajo de concentración ensayado.
- Límite de cuantificación (LOQ): concentración más baja a la que se puede determinar (cuantificar) el analito en la matriz en condiciones aceptables de exactitud y precisión, (recuperaciones entre el 70-120% y $RSD < 20\%$). Para poder obtener el LOQ es necesario por tanto llevar a cabo la validación del método a este nivel.
- Especificidad/selectividad: mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método. Se evalúa mediante el análisis de un blanco de procedimiento o blanco de sistema, una muestra blanco y una muestra blanco fortificada con los analitos al nivel del LOQ. Con este ensayo se intenta

evitar reportar falsos positivos, ya que algunos compuestos presentes en la matriz y que coeluyen con el analito podrían compartir con él la misma relación m/z , tanto de ion precursor como de ion producto. Este hecho es más probable que pueda darse cuando la matriz es más compleja y menos específica sea la transición seleccionada (pérdidas de H_2O , CO_2).

- Confirmación de la identidad del analito en la muestra mediante evaluación de la relación iónica q/Q y el tiempo de retención. Se tiene en cuenta, por tanto, la relación de intensidades correspondientes a la transición de confirmación (q) y la de cuantificación (Q). Según la última guía SANCO/12571/2013, la tolerancia máxima para q/Q en la muestra debe ser $\pm 30\%$ con respecto al patrón de referencia, y la tolerancia en el tiempo de retención del analito en la muestra y del patrón de referencia no debe exceder los ± 0.2 min.

Todos los métodos para ARP desarrollados en esta Tesis en matrices de suelos y alimentos han sido validados teniendo en cuenta los parámetros y requisitos anteriormente indicados. Si bien, la tolerancia máxima aplicada para la relación q/Q fue del 20-50%, en función del valor de q/Q , y la del tiempo de retención fue del $\pm 2.5\%$, en el primer trabajo realizado en frutas tropicales y en el trabajo sobre glifosato en suelos, de acuerdo con la guía SANCO vigente entonces.

1.2.- Métodos de análisis basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

1.2.1.- LC-MS/MS con analizador de triple cuádruplo

El acoplamiento LC-MS/MS continúa ganando popularidad en ARP, de modo que hoy en día es difícil pensar que exista un laboratorio especializado en este campo que no disponga de uno o más equipos de LC-MS/MS, generalmente con analizador QqQ. Esta técnica permite abordar la determinación de analitos que, por su termolabilidad, falta de volatilidad y/o alta polaridad, resultan problemáticos en su análisis mediante GC-MS (p.e. fenoxiácidos, numerosos herbicidas, insecticidas carbamatos,...). Se trata de una técnica excelente para la

determinación de la gran mayoría de plaguicidas existentes en la actualidad, así como de sus metabolitos y TPs, los cuales suelen presentar alta polaridad. Permite la detección, cuantificación e identificación fiable a muy bajos niveles de concentración, gracias a su excelente sensibilidad y selectividad. La capacidad identificativa y especificidad, cuando se trabaja en modo *Selected Reaction Monitoring* (SRM) seleccionando varias transiciones específicas para un plaguicida, resultan de gran utilidad en ARP. Por otro lado, LC-MS/MS es muy adecuada para el desarrollo de MRM en los que cada vez se pueden incluir más compuestos, gracias a las continuas mejoras, en cuanto a rapidez de medida y sensibilidad, de los analizadores QqQ. Actualmente, es posible desarrollar métodos para más de 100 compuestos con una única inyección con los nuevos equipos de LC-MS/MS, capaces de determinar de forma fiable estos plaguicidas a niveles del orden de 0.01-0.05 mg/kg (Bruzzoniti, 2014; Kmellár, 2010; Kumar, 2010; Kwon, 2012; Lehotay, 2010).

Como es sabido, LC permite la separación de los componentes de una muestra en función de la afinidad que estos tengan con la fase móvil líquida, que pasa a través de la fase estacionaria sólida (empaquetada en una columna). La naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria son claves en la separación, existiendo diversos mecanismos de separación (Bernal, 2011). El más conocido y utilizado actualmente es LC en fase inversa (RPLC, Reversed Phase Liquid Chromatography), con la fase estacionaria apolar (comúnmente largas cadenas hidrocarbonadas, C₁₈) y la fase móvil polar con mezclas de disolventes de distinta fuerza eulotrópica (típicamente, MeOH:H₂O o ACN:H₂O) a los que se pueden añadir distintos modificadores que ayuden a facilitar la retención, mejorar la separación o la forma de los picos cromatográficos (ej. HCOOH, NH₄Ac, etc...). La separación en RPLC se lleva a cabo en función de los coeficientes de la distribución de los componentes de una muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria, aunque también pueden intervenir otros mecanismos como adsorción/desorción. La retención cromatográfica disminuye generalmente al aumentar la polaridad de analito (Boix, 2014; Grimalt, 2009; Marín, 2010).

En muchos libros de texto y obras especializadas se puede encontrar una discusión detallada de los diversos mecanismos de separación en LC, por lo que en esta Memoria no se abordarán los aspectos generales de esta técnica. Tan sólo comentar que en esta Tesis se ha hecho uso de dos tipos de cromatografía. La primera basada en RPLC, utilizando columnas tipo C₁₈, que, como se ha comentado, es la más popular, versátil, robusta, y la más usada en métodos analíticos de ARP para compuestos de polaridad media-alta (Picó, 2006; Botitsi, 2011)

(Capítulo 2). La segunda se basa en el uso de columnas tipo HILIC (información detallada en el capítulo 3), para la determinación de compuestos muy polares y especialmente problemáticos como el glifosato.

En los últimos años se ha disminuido el tamaño de partícula de la fase estacionaria lo que obliga a utilizar sistemas capaces de soportar las altas presiones generadas al fluir la fase móvil a través de la columna. Así, dependiendo del tamaño de partícula que contiene la fase estacionaria, se puede distinguir entre cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con partículas de hasta 2 μm , y cromatografía líquida de ultra resolución (o ultra presión) (UHPLC), con partículas $<2\mu\text{m}$. Con UHPLC se consigue aumentar la eficacia en las separaciones, con el resultado de cromatogramas más cortos y picos más estrechos y altos, con mejor relación S/N, acortando además el tiempo de análisis y mejorando la sensibilidad. Esta técnica es capaz de detectar analitos con LOQs más bajos debido a las características mencionadas (O'Mahony, 2013; Nuñez, 2012; Guillarme, 2010). Además de las diferencias indicadas entre UHPLC y HPLC, cabe mencionar que UHPLC es más respetuosa con el medio ambiente, ya que en este tipo de cromatografía se reduce el volumen de los disolventes usados comparados con HPLC.

La mayoría de contaminantes orgánicos presentes en muestras ambientales y alimentarias suelen estar presentes en pequeñas concentraciones, del orden de partes por billón (ppb), e incluso partes por trillón (ppt). Para determinar estos compuestos a niveles de concentración tan bajos, sin tediosos tratamientos de muestra, es clave poder usar técnicas basadas en MS/MS con analizadores como QqQ. Así pues, el acoplamiento LC-MS/MS hoy en día es una de las técnicas más usadas en este campo, con la que se consigue, por un lado, la separación del analito (LC) y, por otro, su detección e identificación (MS/MS).

MS es una técnica analítica muy potente, que permite la diferenciación de los compuestos en función de su relación masa-carga (m/z). De este modo, se produce una “doble separación”, la primera en el sistema cromatográfico y la segunda en el sistema de detección, pudiéndose diferenciar compuestos que coeluyen en matrices complejas. Con el acoplamiento MS/MS se puede detectar, identificar y cuantificar compuestos conocidos (*target* o diana), seleccionados previamente al análisis, con elevada exactitud, precisión, especificidad y sensibilidad. Para ello, los analizadores más adecuados son los de QqQ. Además, mediante MS también se puede extraer información muy valiosa para elucidar la estructura molecular de compuestos

desconocidos, haciendo uso comúnmente de alta resolución, como los analizadores de tiempo de vuelo (TOF).

Los trabajos presentados en esta tesis se fundamentan en métodos analíticos basados en LC-MS/MS con analizador QqQ. Un espectrómetro de masas QqQ consta de dos analizadores (cuadrapolos), que actúan como filtro de iones en función de sus relaciones masa-carga (m/z), separados por una celda de colisión la cual puede tratarse de un hexapolo/octapolo (instrumentos más antiguos) u otro tipo de dispositivos, en instrumentos más modernos, como puede ser el *T-Wave*, que consta de una serie de cilindros donde se aplica una corriente en forma de onda. Los equipos de masas más modernos permiten mayores velocidades de barrido manteniendo la sensibilidad, incluso a bajos *dwell times* (tiempo de adquisición por ion/transición), del orden de 3ms. Esta característica es la clave de su compatibilidad con los sistemas cromatográficos UHPLC. El fundamento de la detección con un analizador QqQ, trabajando en modo SRM, es el siguiente: un ion (ion precursor) es seleccionado en el primer cuadrapolo y pasa a través de la celda de colisión donde colisiona con las moléculas de un gas inerte (Argón), produciéndose la fragmentación en uno o varios iones (iones producto), dependiendo de la estructura química del ion precursor seleccionado. Este fenómeno recibe el nombre de disociación inducida por colisión (*collision induced dissociation*, CID). Los iones obtenidos pasan al segundo cuadrapolo donde se selecciona uno de ellos, el cual llegará al detector. Con este modo de trabajo se consigue: a) elevada sensibilidad, al disminuir el ruido de fondo por la ausencia de respuesta del resto de compuestos presentes en la matriz; b) muy buena selectividad, diferenciando el analito del resto de compuestos de la muestra, gracias a las diferentes fragmentaciones que presentan las moléculas, sin necesidad de llevar a cabo una separación cromatográfica previa exhaustiva, pudiendo incluso diferenciar entre analitos isobáricos (misma masa nominal); c) gran especificidad intrínseca al poder adquirir simultáneamente varias transiciones específicas (ion precursor > ion producto), permitiendo aumentar de forma notable la fiabilidad en las identificaciones de los analitos.

Además del modo de trabajo SRM, con un analizador QqQ se puede trabajar de otras formas en función del objetivo final de trabajo:

- Modo MS, en donde el QqQ trabaja con un solo cuadrapolo. Esta configuración permite trabajar en modo *full scan* o barrido completo de iones en un determinado rango m/z , y en modo *Selected Ion Monitoring* (SIM) por selección de un ion de m/z

determinada. Cuando se trabaja en modo MS, se presentan numerosos hándicaps respecto al modo MS/MS, como la disminución de la sensibilidad por aumento del ruido de fondo, al ampliarse sobremanera las posibilidades de que existan componentes de la matriz con la misma m/z ; o la menor selectividad y especificidad, consecuencia de la escasa fragmentación, obteniéndose información fiable sobre la masa del compuesto pero muy poca información estructural, la cual es fundamental para asegurar la identidad del compuesto causante de la señal cromatográfica obtenida.

- Modo MS/MS, en donde existen varias opciones, como son barrido de los iones producto obtenidos al fragmentar una determinada m/z , barrido de los iones precursores, búsqueda de pérdidas neutras, o trabajo en modo SRM, tal como se ha descrito anteriormente.

En conclusión, el analizador de triple cuadrupolo operando en modo SRM es una herramienta muy valiosa tanto para la cuantificación (elevada selectividad y sensibilidad), como para la confirmación de compuestos (elevada especificidad). Sin embargo, en cuanto a la realización de tareas de *screening* o monitorización de compuestos orgánicos no seleccionados “a priori”, está claramente limitado debido a su bajo poder de resolución, generalmente resolución unidad (diferencias entre masas que están separadas entre sí por 1 uma) y a su baja sensibilidad en modo de “full scan” (Gracia-Lor, 2013). A continuación, se muestra un esquema con los componentes de un espectrómetro de masas QqQ, así como el modo de trabajo SRM (**Figura 1.3**).

En esta Tesis Doctoral, todos los métodos desarrollados se han basado en el uso de espectrometría de masas en tándem con QqQ en modo SRM.

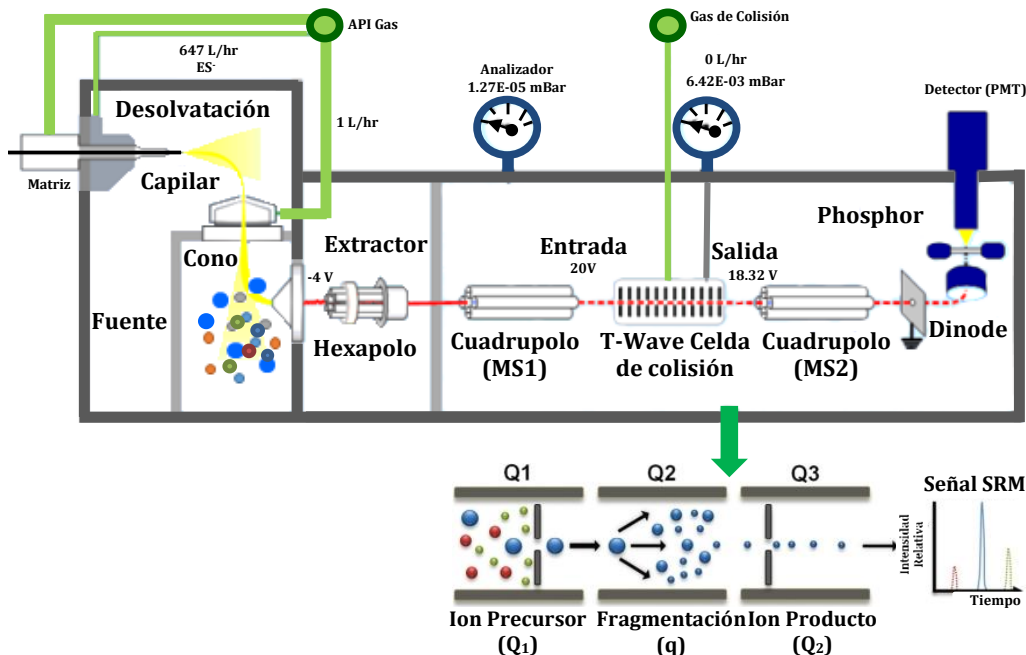


Figura 1.3 Esquema de un analizador de triple cuadrupolo. Modo de trabajo en tándem MS en modo SRM (selección del ion precursor y de los iones producto).

Como ya se mencionó anteriormente, el acoplamiento de un espectrómetro de masas a un sistema de LC utiliza principalmente dos interfases API: ESI y APCI. En los trabajos realizados en esta Tesis solo se utilizó la fuente ESI, por ser la más universal y la de mayor aplicación en ARP en alimentos y muestras medioambientales (Kumar, 2010; Picó, 2008; Botitsi, 2010; Krueve, 2008). En esta interfase, los analitos disueltos en la fase móvil pasan por un capilar de acero inoxidable a presión atmosférica sometido a un voltaje alto, del orden de 3-6kV. La corriente de líquido que fluye a través del capilar se dispersa y las moléculas del disolvente y de los analitos forman un spray de gotas altamente cargadas (nebulización) y son desolvatadas al atravesar la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas (aprox. a 120°C). La desolvatación es asistida por una corriente de gas que, por lo general, es nitrógeno (aprox. a 350°C). Las gotas se van haciendo cada vez más pequeñas a medida que se evapora el disolvente, hasta que las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie producen una ruptura de la gota originando finalmente iones en fase gaseosa. Estos iones formados en ESI pueden estar cargados de manera positiva o negativa. La mayoría se

presentan como iones en modo positivo, normalmente como moléculas protonadas $[M+H]^+$, aductos sodiados $[M+Na]^+$, amoniados $[M+NH_4]^+$ y/o potásicos $[M+K]^+$. En el modo de ionización negativo se forman con frecuencia las moléculas (des)protonadas $[M-H]^-$ y aductos con formiato o acetato. Estos iones, positivos o negativos, llegan al detector de masas por medio de lentes focalizadoras.

Como se mencionará más adelante, en los capítulos 2 y 3 de la presente Tesis Doctoral, se exploró someramente el potencial del analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) para investigar algunos interferentes presentes en la matriz que afectaban el desarrollo y cuantificación de los métodos. El analizador QTOF combina dos analizadores de MS distintos, un cuadrupolo y un analizador de alta resolución, como es el tiempo de vuelo. La posibilidad de obtener el espectro de iones producto con masa exacta permite identificar de manera mucho más fiable los compuestos presentes en la muestra. El QTOF presenta grandes ventajas, como son su elevada sensibilidad en modo de barrido de iones, su elevado poder de resolución y la posibilidad de obtener medidas en masa exacta de los iones detectados. Por ello, se considera la herramienta ideal para realizar tareas de *screening* de numerosos compuestos orgánicos (conocidos y desconocidos) en el medio ambiente y en muestras de alimentos, con un elevado potencial de identificación y de elucidación. A pesar de sus evidentes ventajas, este analizador tiene ciertas limitaciones ya que la sensibilidad para determinados compuestos es baja y el rango de respuesta lineal es menor comparado con un analizador de triple cuadrupolo (QqQ), lo que dificulta llevar a cabo la cuantificación (sobre todo a niveles bajos de concentración).

A pesar de las evidentes ventajas del acoplamiento LC-MS/MS, como herramienta analítica poderosa en ARP en muestras de gran complejidad, no debe obviarse un hándicap muy importante debido a la diferencia en la ionización de los analitos en solvente y en muestra. Ello puede conducir a errores notables en los análisis cuantitativos si no se corrige este efecto. Los distintos componentes de la matriz pueden afectar a la ionización del analito cuando coeluyen con él, provocando exaltación o supresión de la señal. Esto supone un problema en los análisis, pues afecta a la cuantificación principalmente, pero también a la identificación, ya que si una de las transiciones escogidas está interferida, no se obtendrá la relación iónica q/Q esperada, pudiendo provocar un falso negativo. Este hecho, conocido como efecto matriz (ME), también afecta a la robustez del método desarrollado y es necesario corregirlo, minimizarlo o eliminarlo para obtener resultados satisfactorios.

A continuación, se discuten con más detalle posibles estrategias para corregir el efecto matriz, compensando de este modo la supresión o la exaltación de señal, que afectaría indiscriminadamente a la detección y cuantificación de los compuestos objeto de estudio.

1.2.2. Efecto matriz en LC-MS/MS

En todo método analítico es necesario garantizar la calidad y fiabilidad en el momento de presentar los datos (cuantificaciones correctas), evitando además reportar falsos positivos o falsos negativos.

Existen dos aspectos fundamentales en todo método analítico: la correcta cuantificación y la identificación fiable del analito. Ambos aspectos deben quedar completamente asegurados en cualquier método de análisis, en cualquier campo de aplicación, y evidentemente también en ARP. Cuando se usan detectores convencionales en LC, como UV, UV-DAD o fluorescencia, muchas veces hay problemas de cuantificación, no sólo por la falta de sensibilidad, que impide alcanzar los bajos niveles de concentración exigidos actualmente, sino también porque los componentes de la matriz pueden afectar a la medida del analito ya que ésta no suele ser muy específica (por ej. muchos compuestos orgánicos absorben en la misma región de longitud de onda que el analito). Como ya se ha comentado con anterioridad, en LC-MS/MS las medidas son más selectivas, pudiendo distinguir el analito del resto de componentes de la matriz, pues aunque pudieran tener la misma masa nominal (isobáricos), no suelen compartir la misma transición, especialmente cuando se evitan transiciones derivadas de pérdidas genéricas, como H_2O , CO_2 , etc. Por ello, los cromatogramas LC-MS/MS son, en general, más limpios y no es tan habitual la presencia de otros picos cromatográficos, además del correspondiente al analito, como ocurre frecuentemente con detectores convencionales.

Sin embargo, aun cuando no es habitual la presencia de picos cromatográficos que interfieren con los de los analitos, sí que es frecuente observar efecto matriz. Así, cuando se comparan las respuestas cromatográficas de un patrón preparado en solvente y de un extracto de muestra fortificado al mismo nivel de concentración, muchas veces no existe concordancia entre ellas. Esto se debe a la presencia de compuestos de la matriz que coeluyen con el analito, que, aunque no compartan la misma transición que éste, afectan a su ionización en la interfase, haciendo que la respuesta sea distinta en ausencia o presencia de matriz. Muchos de los

errores de cuantificación se deben a este efecto matriz cuando no es suficientemente estudiado y solo se trabaja con patrones externos en solvente, sin ningún tipo de corrección.

El ME se puede definir como la supresión o exaltación de señal no esperada, causada por los componentes de la matriz distintos al analito y que coeluyen con él en la separación cromatográfica. Las especies que producen este efecto pueden ser componentes de la muestra, componentes liberados durante el proceso de pre-tratamiento/extracción, o agentes añadidos en la fase móvil para mejorar la resolución y/o respuesta cromatográfica (Gosetti, 2010).

Se presume que el mecanismo que origina este fenómeno es la competición entre los componentes no volátiles de la matriz y los iones de los analitos al acceder a la superficie de las gotas y pasar al estado gaseoso. Esto tiene lugar en la fuente de ionización y suele ser algo más pronunciado en ESI que en APCI (Kruve, 2008; Kwon, 2012; Cappiello, 2010), aunque algunos autores observan un ME similar en ambas interfaces (Antignac, 2005).

El ME depende de varios factores, entre los que destacan la naturaleza química del analito (acidez o basicidad), la matriz objeto de estudio, el ambiente en el que tiene lugar la ionización (interfase utilizada) y naturaleza de los interferentes que eluyen de la columna al mismo tiempo de retención del analito. Los analitos de mayor polaridad son más susceptibles de sufrir la supresión de la ionización (disminución de señal) y son menos propensos a una exaltación (aumento de señal) (Kruve, 2008; Trufelli, 2011; Cappiello, 2010; Taylor, 2005). El ME afecta a prácticamente todas las características analíticas del método, como su exactitud, capacidad identificativa, reproducibilidad, linealidad y límite de cuantificación del método (Gosetti, 2010; Trufelli, 2011; Niessen, 2006). Por ejemplo, aunque el efecto matriz se corrija adecuadamente, una fuerte supresión de la señal en presencia de matriz reduciría notablemente la sensibilidad del método, obteniendo límites de detección y de cuantificación más altos de los esperados a partir del análisis de patrones en solvente. En la **Figura 1.4** se ilustra cómo puede producirse el efecto matriz en una fuente ESI.

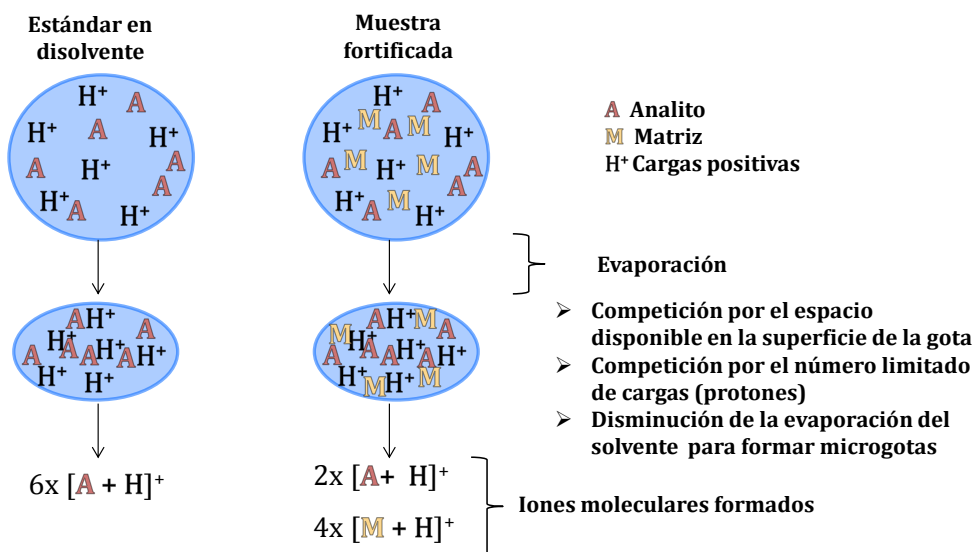


Figura 1.4. Causas de la supresión de señal por efecto matriz en la interfase ESI (Fabregat-Cabello, 2015).

En el desarrollo de un método basado en LC-MS/MS, antes de proceder a su validación, es imprescindible realizar un estudio detallado del ME en la muestra de interés para los analitos seleccionados. Para ello, es de gran ayuda disponer de muestras blanco con las mismas características de la matriz a analizar, algo que resulta más complicado cuando el objeto de análisis son muestras ambientales. El objetivo es comparar las respuestas del patrón en solvente y en matriz, en ambos casos al mismo nivel de concentración. Cuando la respuesta del analito en extracto de muestra es inferior a la del patrón en solvente existe supresión de la señal. En cambio, se obtiene exaltación de la señal cuando la respuesta es mayor en el extracto de la muestra que en el patrón en solvente. Cuando la respuestas son semejantes, con una desviación máxima del orden de $\pm 20\%$ (ME entre 80 y 120%), se considera que el efecto matriz no es relevante.

Es importante no confundir el efecto matriz, que se estudia fortificando extractos de muestra y comparando la respuesta con la del patrón de la misma concentración en solvente, con la eficiencia del proceso global de análisis (*process efficiency (PE)*), que es el resultado de la recuperación global obtenida en la etapa de extracción y cualquier otra de manipulación de muestra (ej. *clean-up*) junto con la medida final del analito (Gracia-Lor, 2011; Trufelli, 2011).

Este segundo parámetro se evalúa fortificando una muestra al principio (antes de la extracción), comparando la respuesta obtenida en el extracto de la muestra con la del patrón en solvente de la misma concentración. En este caso, se trata de la recuperación global, valor que podría quedar enmascarado por el efecto matriz. Por ejemplo, podría ocurrir que una baja recuperación en la extracción (ej. del 60%) se viera compensada por un efecto matriz de exaltación de la señal (ej. del 140%), con lo que la recuperación final aparente podría ser del 100%.

Existen varias alternativas para corregir/minimizar/eliminar el efecto matriz. Una de ellas consiste en realizar modificaciones en el tratamiento de muestra; por ejemplo, aplicando procesos más selectivos de extracción o etapas de *clean-up* con el objeto de disminuir los compuestos coextraídos que causan el ME (Niessen, 2006). La principal desventaja es el aumento en el tiempo de análisis y la mayor manipulación de la muestra, lo cual complica el método analítico y puede provocar mayores errores analíticos asociados al tratamiento de muestra. Además, en MRM muchas veces no es posible aplicar extracciones ni etapas de purificación muy selectivas.

Una elección bastante frecuente en ARP es el uso de calibrado matriz, preparando los patrones en extracto blanco de matriz. Con ello, se consigue que la señal de patrones y muestras se vea afectada de modo similar por los componentes de la matriz, con lo que se corrige el ME de modo eficaz, aunque no se elimina ni tampoco se minimiza. La limitación de esta aproximación es la necesidad de disponer de un blanco homogéneo y representativo de la matriz que se va a analizar, con características similares a las muestras. Como ya se ha mencionado, en matrices de tipo ambiental, como son suelos, sedimentos o aguas, esta medida es de difícil ejecución, pues es complicado encontrar una matriz semejante a todas las muestras que se van a analizar y que además sea blanco, es decir, que no contenga ninguno de los analitos incluidos en el método. Sin embargo, en matrices de tipo vegetal no suele ser tan problemático, pues muchas veces se pueden conseguir muestras blanco representativas (ej. lechugas, tomates, zanahorias, etc...) procedentes de la agricultura biológica, la cuales se pueden usar para la preparación de los calibrados en matriz.

El método de adiciones estándar es otra alternativa para corregir el ME. Este método es ampliamente usado en Química Analítica en todo tipo de métodos y técnicas analíticas, ya que tiene en cuenta el efecto que produce la matriz de la muestra sobre la señal del analito. Se

añaden cantidades crecientes del analito a una cantidad fija de muestra y con ello se construye la curva de calibrado sobre la propia muestra. La concentración final se obtiene por extrapolación al origen ($y=0$, en una ecuación del calibrado del tipo $y=ax+b$). El principal inconveniente de esta aproximación es el incremento en el tiempo de análisis, pues se necesitarán varias inyecciones por muestra. Por otra parte, y esto es muy importante, se requiere un conocimiento previo de la concentración aproximada del analito para poder ajustar las adiciones, ya que estas deberían ser del mismo orden de la cantidad presente en la muestra para minimizar el error en el cálculo por extrapolación.

Una solución muy sencilla para minimizar el efecto matriz es la dilución del extracto de muestra. Esta dilución disminuye la concentración de todos los componentes presentes en la misma, de forma que la respuesta de los analitos en la matriz puede llegar a ser comparable a la de los patrones en solvente. La dilución de la muestra puede presentar también otras ventajas, como mejores formas de pico, mayor reproducibilidad en los tiempos de retención y mayor duración de la columna cromatográfica. El principal inconveniente es la pérdida de sensibilidad del método inherente a la dilución, por lo que no es muy aconsejable cuando se requiere el máximo de sensibilidad. No obstante, con el uso de equipos LC-MS/MS QqQ de última generación, con excelentes prestaciones, particularmente con sensibilidades muy altas, esta limitación muchas veces no llega a ser un problema, por lo que la dilución del extracto se muestra hoy en día como una de las formas más sencillas para la corrección del efecto matriz.

El uso de patrón interno (*Internal Standard*, IS) aparece como una de las mejores opciones para corregir el ME. Lo ideal es utilizar un patrón interno marcado isotópicamente (*Isotope-Labeled Internal Standard*, ILIS). Un patrón interno adecuado debe presentar características fisicoquímicas similares a las del compuesto objeto de estudio, debe tener similar tiempo de retención cromatográfica, ionización semejante al analito en la interfase y fragmentación en la celda de colisión, y, al mismo tiempo, no puede estar presente en la muestra (Trufelli, 2011). El ILIS ideal es el propio analito marcado, ya que su comportamiento cromatográfico y frente a la ionización será semejante al del analito. Los patrones marcados con ^{13}C y deuterio (^2H) son los más utilizados pues su abundancia en la naturaleza es baja, entre el 1 y 0.015%, lo que hace que no interfieran en la cuantificación.

El ILIS se puede añadir en fases diferentes del proceso analítico: a) al principio del proceso, directamente a la muestra antes de la extracción; en este caso se utiliza como patrón de control (*surrogate*), con lo que se puede corregir no sólo el efecto matriz sino también cualquier pérdida que tenga lugar en el tratamiento de la muestra y/ variaciones instrumentales o del proceso de inyección; b) en el extracto final, justo antes de la inyección en el sistema cromatográfico; en este caso se usa para corregir el efecto matriz más las variaciones que pueda tener el equipo (Gosetti, 2010).

El uso de ILIS se muestra como la solución ideal pero su principal problema es la limitada disponibilidad comercial de patrones marcados y su alto coste. Por ello, en MRM es prácticamente imposible usar tantos ILIS como analitos, especialmente cuando se trata de métodos con varias decenas de compuestos, tanto por problemas de disponibilidad como de índole económico (Niessen, 2006). Cuando no se dispone del propio analito marcado, se puede intentar hacer la corrección con otro patrón interno similar. Hay que tener en cuenta que deben presentar similitud entre las estructuras químicas, y que los tiempos de retención deben ser prácticamente iguales para que se vean afectados por los mismos componentes de la matriz. Sin embargo, por muy semejantes que sean el analito y el ILIS, cuando se utilizan compuestos análogos para la corrección, no siempre se pueden asegurar resultados satisfactorios (Marín, 2009).

1.3. Trabajo realizado en esta Tesis Doctoral

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado metodología analítica para la determinación de residuos de plaguicidas en distintas matrices alimentarias y ambientales. Toda la metodología desarrollada se ha basado en el uso de equipos LC-MS/MS con analizador QqQ y se ha centrado en aspectos cuantitativos, sin olvidar la identificación fiable de los compuestos detectados en las muestras.

Por un lado, se ha abordado la determinación de plaguicidas utilizados en la agricultura Latinoamericana, en concreto con muestras procedentes de Colombia y Argentina, analizando por un lado matrices vegetales (principalmente frutas tropicales) y por otro lado suelos. Para ello, se han desarrollado MRM para frutas tropicales, incluyendo aquellas más populares y de mayor valor económico en Colombia, y seleccionando plaguicidas de amplio uso en ese país

(Capítulo 2, sección 2.1 y 2.2.). También se ha desarrollado un MRM para suelos representativos de la agricultura de Argentina en el marco de una colaboración con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Balcarce, Argentina (Capítulo 2, sección 2.3). En algunos casos se presentaron especiales dificultades analíticas, debido a la complejidad de la matriz (suelos con altos contenidos de materia orgánica, frutas tropicales) o a la naturaleza del compuesto en sí (MCPA, picloram, quinclorac).

Un caso particular fue el glifosato y su metabolito AMPA, cuyas dificultades analíticas son de sobra conocidas. Para este compuesto, se tuvo que desarrollar metodología específica, tanto previa derivatización con FMOC como directamente sin derivatización, usando distintos tipos de columnas cromatográficas. Un caso especialmente problemático fue la determinación de glifosato y AMPA en suelos de Colombia y de Argentina, por la gran dificultad de este tipo de matrices (Capítulo 3, sección 3.1). Asimismo, se desarrolló un método novedoso para residuos de glifosato, sin efectuar derivatización previa, en muestras de cereales y soja (Capítulo 3, sección 3.2).

Los tratamientos de muestra aplicados en esta Tesis Doctoral han sido convencionales. Básicamente, han consistido en extracciones con disolventes típicamente utilizados en métodos LC (ACN, H₂O), seguidas de la dilución del extracto para minimizar el efecto matriz, con el propósito de reducir el tratamiento de la muestra. Tan sólo en el caso de glifosato en suelos se utilizaron etapas de purificación mediante SPE, y de derivatización (FMOC-Cl).

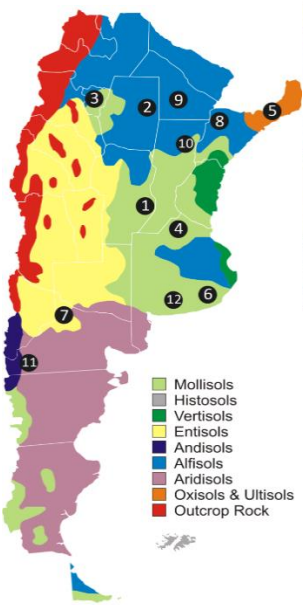
Se ha prestado especial atención a la corrección del ME, considerado el *talón de Aquiles* de la técnica LC-MS/MS. Para ello, se han aplicado varias aproximaciones: uso de ILIS, corrección mediante calibrados en matriz y aplicación de factores de corrección obtenidos por comparaciones de la pendiente del calibrado en solvente y en distintas matrices.

Para completar el trabajo con la técnica LC-MS/MS QqQ, se ha incluido en la parte final de la Tesis (Capítulo 4) la determinación de residuos de drogas de abuso en aguas residuales. Esta es una línea prioritaria de investigación del IUPA en los últimos años, y por ello se ha abordado este tipo de análisis en el marco de lo que se conoce como epidemiología de las aguas residuales (*Wastewater-Based Epidemiology*, WBE). Haciendo uso de metodología analítica desarrollada en nuestro grupo de investigación, se han analizado muestras de aguas residuales (influyente urbano) de las ciudades de Castellón, Murcia, Bogotá y Medellín, con el fin de determinar los niveles de concentración de las drogas seleccionadas (cocaína, su

metabolito benzoylecgonina (BE), anfetamina, metamfetamina, el principal metabolito del cannabis THC-COOH, ketamina, 6-monoacetilmorfina y MDMA (éxtasis)). Con los resultados obtenidos se ha estimado la carga diaria de estas drogas en las aguas residuales de las poblaciones indicadas. En aquellos casos en los que se disponía de información suficiente y contrastada sobre la excreción del metabolito/biomarcador en orina, se pudo hacer una estimación del consumo de droga en la población (caso de la cocaína y su metabolito BE). Cabe destacar que estos datos son los primeros reportados referentes a ciudades de Colombia.

Capítulo 2

Determinación multi-residual
de plaguicidas mediante LC-MS/MS



Name of Soil	Zone
Marco Juarez	1
Sgo del Estero	2
Famaillá	3
Pergamino	4
Cerro Azul	5
Balcarce	6
Alto Valle	7
Corrientes	8
Chaco	9
Reconquista	10
Cerro amigo	11
Barrow	12

2.1. Método multiresiduo para la determinación de plaguicidas en frutas tropicales

2.1.1. Introducción

Colombia participa en el mercado internacional de frutas mayoritariamente mediante la exportación de frutas tradicionales y exóticas. En cuanto a las frutas tradicionales, los principales productos son las musáceas, que incluyen banano, bananito y plátano, cuya comercialización en el mercado exterior ha sido muy favorable (MinSalud, 2012). En 2010 Colombia exportó 1.8 millones de toneladas de musáceas, siendo, tras el café, los productos agrícolas colombianos más vendidos en el exterior. En lo que respecta a las frutas exóticas tropicales, como uchuva, tomate de árbol y gulupa, se evidencia un notable incremento con respecto a años anteriores en la balanza comercial frutícola colombiana; sin embargo, las exportaciones son comparativamente pequeñas con respecto al banano (Osan, 2012).

En los últimos años, la demanda de frutas exóticas ha presentado una tendencia creciente en el mercado internacional debido, en parte, a su gran valoración por sus aportes nutricionales. Las frutas exóticas tienen un alto contenido en agua, y fibra, lo que las convierte en laxantes y muy digestivas. Tienen un gran aporte vitamínico y un alto contenido de potasio, hierro y calcio (FAO, 2003; Legiscomex, 2013). Además, se caracterizan por su apariencia, sabores únicos y peculiares que, junto a sus aromas característicos, las hacen muy diferentes a las frutas tradicionales.

Las exportaciones de frutas exóticas colombianas han presentado un crecimiento notable situando al país como el noveno proveedor del mundo. A modo de ejemplo, en 2012 las exportaciones colombianas aportaron alrededor de 48,6 millones de dólares. La uchuva fue la fruta más vendida en mercados internacionales alcanzando un montante de negocio cifrado en 29,2 millones de dólares. Tras la uchuva, se encuentra la gulupa, con 12 millones, la granadilla con 2,9 millones, la pitahaya con 2 millones y el tomate de árbol con 1,3 millones (Legiscomex, 2013; La Republica, 2012). La **Tabla 2.1** muestra la balanza comercial de frutas exóticas en Colombia en el año 2012.

Estudios del mercado internacional muestran a los países de la Unión Europea (Holanda, Alemania, Francia, Bélgica, España, Dinamarca, Finlandia, Polonia, Portugal, Italia, Reino Unido) como los mayores consumidores de fruta en el mundo (Agroindustria, 2014; Proexport, 2013). El consumidor europeo busca nuevos sabores, como los que aportan las frutas exóticas y, en general, es exigente ya que busca un producto elaborado bajo procesos con poco impacto en el medioambiente y estándares del comercio justo (Fairtrade) (Legiscomex, 2013).

Tabla 2.1 Balanza comercial de las frutas exóticas en Colombia, 2012

Balanza comercial de la frutas exóticas durante el 2012, valor USD (dólares americanos)			
Fruta exótica	Exportaciones	Importaciones	Balanza comercial
Uchuvas	29.257.466		29.257.466
Gulupa	12.047.548		12.047.548
Granadilla	2.905.843		2.905.843
Pitahayas	2.009.774		2.009.774
Tomate de árbol	1.333.157		1.333.157
Maracuyá	389.219	284.526	104.693
Feijoa	292.123		292.123
Chirimoya, guanábana y demás anonas	79.740	12.922	66.818
Arándanos rojos	37.447	97.529	-60.082
Mangos y mangostanes	258.503	1.136.676	-878.173
Total	48.610.820	1.531.653	47.079.167

La ubicación geográfica de Colombia favorece los procesos de exportación de frutas frescas, permite menores tiempos de tránsito, mayor velocidad en las entregas y precios competitivos. Con la entrada en vigencia del tratado de libre comercio entre la Unión Europea y Colombia (Agosto de 2013), se proyectan nuevas y mejores oportunidades para el mercado de estos productos. Hasta entonces, el sector de frutas frescas pagaba aranceles base de hasta el 17,6%, o aranceles más específicos, pero con el nuevo tratado dichos productos ingresan libres de cualquier arancel (Bancoldex, 2014a).

La **Figura 2.1** muestra los principales destinos de las exportaciones de las frutas tropicales más relevantes (Legiscomex, 2013).



Uso de plaguicidas en Colombia

Colombia es un país agrícola por excelencia y por ello el uso de plaguicidas se ha convertido en una necesidad básica en sus cultivos, tanto de frutas como de hortalizas, para combatir de forma eficaz la acción de las plagas y malas hierbas que pueden interferir negativamente en la producción. Desafortunadamente el uso excesivo de estos compuestos, puede provocar serios problemas de contaminaciones al quedar residuos en los alimentos debido a su aplicación directa sobre los cultivos. Estos residuos pueden suponer un riesgo para los consumidores, particularmente cuando se ingieren grandes cantidades de alimentos contaminados (Elika, 2011; FAO, 2014).

Según cifras del Banco Mundial, el uso anual de plaguicidas en Colombia aumentó de forma espectacular a partir de 1997, con un incremento de casi el 400% en 1998. Entre 1990 y 1996 el consumo anual fue inferior a 20.000 toneladas (Tn), mientras que entre 1998 y 2010 el consumo medio superó las 48.000 Tn, destacando el periodo entre 1998 y 2000 con más de 100.000 Tn anuales, alcanzando un máximo de 151.686 Tn en el año 2000. Sin embargo, a partir de 2005 se observa una disminución considerable (**Figura 2.2**).

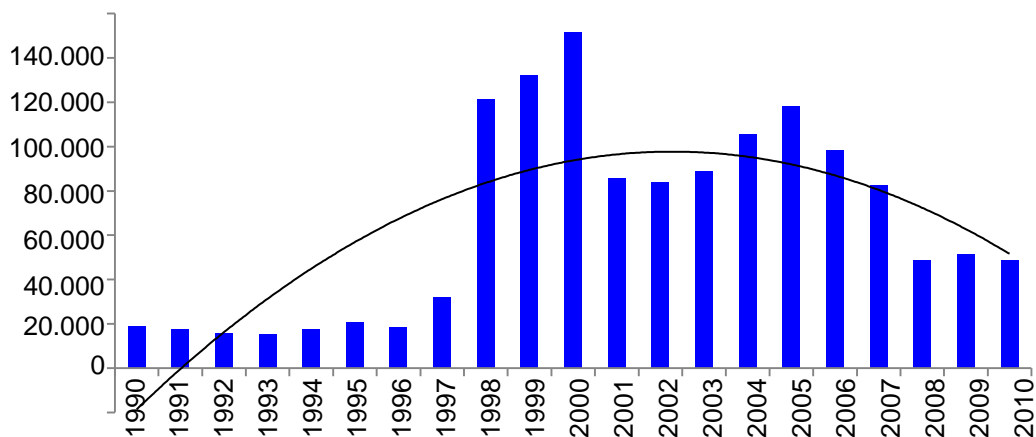


Figura 2.2 Consumo agregado de plaguicidas en Colombia (Tn) (1990 - 2010) (Fuente: GEE-SIC a partir de datos de Banco Mundial).

En cuanto a las materias activas más utilizadas, en la **Tabla 2.2.** se indican los principales plaguicidas producidos y vendidos en el país en 2012, ordenados por ingrediente activo (ICA, 2012).

Tabla 2.2 Producción y venta de plaguicidas químicos de uso agrícola por ingrediente activo. Año 2012.

Tipo de acción	Ingrediente activo	Kg		Lt	
		Producción	Ventas	Producción	Ventas
Fungicida	Captan	27.690	129.100	30.851	7.056
	Carbedazim	69.669	105.705	254.801	319.295
	Clorotalonil		976.797		902.865
	Difeconazol			149.970	173.712
	Mancozeb	1.701.501	1.979.594	5.564.255	3.095.705
	Mancozeb + oxiclورو de cobre	412.229	406.880		
	Oxicloruro de cobre	19.280	197.335		
	Propiconazol			153.625	101.155
	Propineb + cymoxanil	602.640	401.120		
	Validamicina	326.974	328.959		
Herbicida	2,4-D	677.195	974.998	3.441.061	2.147.700
	Ametrina			404.819	322.060
	Atrazina		135.276	89.634	57.976
	Butaclor			185.967	222.384
	Diuron	396.277	767.835	269.588	183.452
	Glifosato		48.048	5.866.257	6.661.454
	Glufosinato de amonio			487.054	379.010
	Paraquat	976.516	1.071.467	2.061.174	1.918.493
	Pendimetalina	429.060		487.280	174.422
	Picloram	3.557	2.254	587.169	523.565
	Picloram + 2,4 d amina			747.119	1.056.084
	Propanil		95.394	1.299.132	1.001.636
	Terbutrina			355.171	218.640
Insecticida	Carbofuran	155.423	127.611	29.515	25.750
	Cipermetrina	63.116	79.616	309.240	319.517
	Clorpirifos	1.044.272	1.369.727	2.947.277	2.562.888
	Fipronil		1176	201.437	158.734
	Flutriafol				133.502
	Malation			215.086	132.764
	Metaldehído	400.397	273.518		
	Metamidofos			481.230	331.514
	Metomil	24.826	36.2009	317.782	362.014
	Monocrotofos	94.762	117.956	80.344	63.495
	Thiametoxam + lambdacihalotrina			157.414	158.159

En la **tabla 2.3** se muestran los plaguicidas importados, por ingrediente activo, materia prima y producto formulado, a fecha de diciembre 2012 (ICA, 2012).

Tabla 2.3 Importación de plaguicidas químicos de uso agrícola por tipo de control e ingrediente activo. Año 2012

Tipo de control	Ingrediente activo	Ingrediente activo		Materia prima		Producto formulado	
		Kg	Lt	Kg	Lt	Kg	LT
Aditivos	3,4 dicloroanilina			378.000			
	Bisulfuro de Carbono				2.669.340		
	EDTA				1.980.120		
	Eterglicol alquil fenólico				429.013		
	Hidróxido de sodio				5.369.474		
	Lignosulfato de sodio			900.105			
	Mono-iso- propilamina			260.000	468.400		
	Saflufenacil					289.860	
	Trisopropanolamine				1.682.976		
Fungicida	Azoxystrobin	200.000	100.000			100.000	100.000
	Azufre					571.976	14.544
	Captan	125.000				10.000	10.000
	Carbendazim	839.000	12.000	34.000			
	Cimoxanil	145.405			120.000		80.000
	Clorotalonil	400.300		36.000	10.000	309.000	280.000
	Difenoconazol	211.940			1000	32.000	80.000
	Fenpropimorf						400.000
	Fosetil aluminio	200.000					
	Mancozeb	70.000			8.240.858	556.620	240.000
	Oxicloruro de cobre				100.000	110.000	
	Propanil	420.000					
	Propiconazol	100.000	8000	75.000	32.000		67.000
	Propineb	1.249.475				50.000	
	Pyrimetanil	432.200					35.000
	Tebuconazole	123.000					
Fungicida + insecticida	2,4-D acido	1.003.910	2.772.000	244.000	53.000		
	Butaclor	200.000					
	Dimetilamina			50.000	300.000		
	Diuron	524.000		50.000		275.000	
	Glifosato	1.313.600		1.250.000	887.864	20.000	950.000
	Metsulfuron metil				2000	2.128.103	
Insecticida	Paraquat + diuron						1.058.640
	Abamectina					10.000	352.000
	Clorpirifos	10.000		840.000		2000	50.000
	Imidacloprid	300.000				3000	60.000
	Metamidofos	350.000					100.000
	Methomyl	200.000					
	Monocrotofos	250.000					

La mayoría de estas materias activas están aprobadas en Europa, de acuerdo con la Directiva 91/414/EEC, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Pero algunas de ellas han dejado de comercializarse habiéndose retirado del mercado europeo (Directiva 79/117/EEC relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos

fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas). Con las nuevas regulaciones, algunos plaguicidas, muy conocidos y que han sido muy utilizados, como ametrina, atrazina, butaclor, carbaryl, carbendazima, carbofuran, cianizina, diazinon, metamidofos, monocrotofos, paration, paration metil, propanil, quinclorac y terbutrina, ya no se comercializan en la Unión Europea (Regulation (EC)1107, 2009). Sin embargo, en Colombia estas sustancias cuentan con la aprobación de uso y comercialización, por lo que no sería extraño encontrar positivos de estos compuestos en muestras exportadas hacia la UE.

Entre los insecticidas más vendidos en Colombia se encuentran dos organofosforados, clorpirifos y metamidofos (este último está prohibido en muchos países por sus efectos nocivos para la salud y el medio ambiente). En tercera posición se encuentra un insecticida de la familia de los carbamatos de elevada toxicidad, el carbofuran, cuyo uso está prohibido en Canadá y la Unión Europea. El herbicida glifosato (organofosforado) continúa siendo el más vendido y usado, superando a otros herbicidas como 2,4-D + picloram, y paraquat (Bancoldex, 2014b).

Dentro de las actuales políticas de desarrollo existe una tendencia creciente hacia el establecimiento de garantías de trazabilidad en los alimentos y de mejora, en cuanto a calidad, inocuidad y respeto por el medio ambiente. La presencia de residuos de estos compuestos en los alimentos es una preocupación a nivel internacional, que se enmarca claramente en el campo de la seguridad alimentaria. Además, ha sido uno de los principales hándicaps en el comercio exterior, pues la superación de los MRLs para un plaguicida cierra las puertas en cualquier mercado internacional. De hecho, los MRLs suponen, en la mayoría de los casos, una importante barrera comercial. Todos los alimentos deben estar sujetos al cumplimiento de normas de protección tanto en importación como en exportación (España, 2013).

Los organismos de control colombianos, como el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), velan por la inocuidad agrícola, asegurando que los alimentos procedentes del campo, que se producen para consumo nacional y para exportación, no contengan sustancias químicas y microorganismos que puedan afectar a la salud de los consumidores. Este proceso se fundamenta en la aplicación de las BPAs. Organismos internacionales, como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos y la Agencia de Seguridad Alimentaria

Europea (EFSA), permanecen alerta ante el posible uso inadecuado de los productos fitosanitarios, estableciendo normativas que fomentan un uso sostenible de los mismos.

Como se mencionó anteriormente, Colombia es un país eminentemente agrícola y gran parte de su economía está basada en la producción y exportación de productos del campo. Con el tratado de libre comercio establecido con la EU, debe cumplir ciertas normas de inocuidad para poder comercializarlos en el mercado europeo. El reglamento de la Comisión Europea 396/2005, (European Union Decision, 2005) establece los niveles máximos de residuos permitidos en los alimentos y piensos de origen vegetal, y regula el mercado europeo en lo relativo a residuos de plaguicidas.

El mercado internacional requiere el control, cada vez más estricto, de la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos, y la evaluación de la exposición de los consumidores a estos compuestos, así como reducir el uso de plaguicidas que pueden ser nocivos para el medio ambiente y para la salud humana y animal. Para poder llevar a cabo estas tareas, se requieren metodologías analíticas modernas, altamente selectivas y sensibles, capaces de cuantificar de modo fiable los bajos niveles de residuos de plaguicidas que puedan estar presentes en alimentos y en el medio ambiente.

Compuestos y muestras objeto de estudio

Los plaguicidas seleccionados en esta Tesis Doctoral para el desarrollo de metodología analítica son utilizados con regularidad en el control de plagas y enfermedades de muchos cultivos en Colombia, tanto en cosecha como en post-cosecha (ICA, 2010). Dentro de la lista de compuestos, se han considerado también algunos metabolitos. En la definición de residuo de algunos plaguicidas no sólo se incluye el compuesto inalterado (*parent compound*) sino también uno o más metabolitos relevantes, por lo que es necesario tener en cuenta dichos metabolitos en el momento del análisis. La definición de residuo es suministrada por la EFSA, cuya principal labor es proporcionar información fiable y actualizada sobre los problemas que afectan a la seguridad alimentaria en Europa, ayudando a detectar y alertar sobre dichos problemas y a valorar los riesgos asociados. Muchas veces, los metabolitos se encuentran presentes en las muestras, junto al plaguicida del que proceden, o incluso sin que existan trazas del mismo, y pueden llegar a ser más tóxicos que el compuesto de partida (Marín, 2009).

En la **tabla 2.4** se muestran los plaguicidas objeto de estudio en este capítulo, junto a su estructura química, sus principales metabolitos, y su uso en la agricultura. Como se indicará más adelante, se han desarrollado dos metodologías analíticas para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas tropicales. Los compuestos que se muestran en rojo pertenecen al primer trabajo llevado a cabo, los de color negro son los comunes a ambos métodos, y los de color verde son los que se incorporaron al segundo método, siendo seis de ellos metabolitos (clothianidin, ometoato, 3-hidroxi-carbofuran, 3,4 dicloroanilina, malaoxon, paraoxon-methyl).

En cuanto a las matrices estudiadas, se han seleccionado un total de doce frutas tropicales. Éstas frutas tienen una presencia media/alta en el mercado internacional y nacional, por su considerable consumo, y son valoradas por su textura, aroma y sabor, diferentes a las frutas convencionales. Las frutas tropicales seleccionadas se han clasificado dentro de los grupos incluidos en el Anexo I del Reglamento (EC) 396/2005 (Productos de origen vegetal y animal a los que se refiere el Artículo 2.1) (European Union Decision, 2005), teniendo en cuenta sus nombres comunes y científicos, para dar cumplimiento a los MRLs.

En la **Tabla 2.5** se muestra la clasificación científica y el nombre común con que se conoce a las frutas tropicales seleccionadas en diferentes países. Más adelante (**Figura 1, artículo científico 2**) se muestran los grupos a los que pertenecen, de acuerdo con la clasificación para el establecimiento de MRLs.

Tabla 2.4 Plaguicidas estudiados en esta Tesis Doctoral (a).

Compuesto/Uso	Estructura	Compuesto/Uso	Estructura
Ametrina (AME) Herbicida		2,4 D (2,4D) Herbicida	
Atrazina (ATR) Herbicida		3,4-diclororanimina (3,4 DCN) Herbicida	
Azoxistrobina (AZO) Funguicida		Dimetoato (DIM) Insecticida	
Butaclor (BUT) Herbicida		Diuron (DIU) Herbicida	
Carbendazima (CAR) Funguicida		Fludioxonil (FLU) Funguicida	
Carbofuran (CRB) Insecticida		Fluazinam (FLU) Funguicida	
Ciprodinil (CYP) Funguicida		3-Hydroxycarbofuran (3-OH) Insecticida	
Clomazon (CLO) Herbicida		Imazalil (IMA) Funguicida	
Clorpirifos (CHLOR) Insecticida		Imidacloprid (IMI) Insecticida	
Clotianidina (CLOT) Insecticida		Malation (MAL) Insecticida	

Tabla 2.4 Plaguicidas estudiados en esta Tesis Doctoral (b)

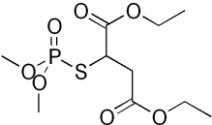
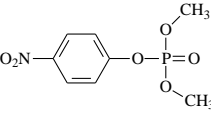
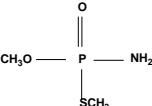
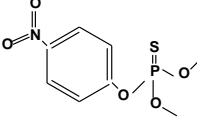
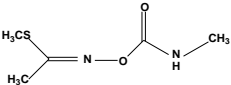
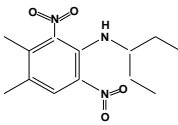
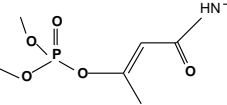
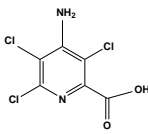
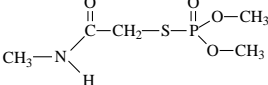
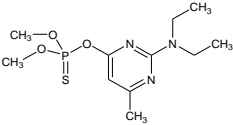
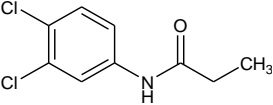
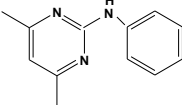
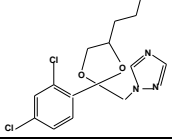
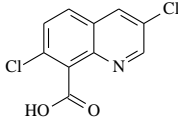
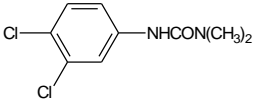
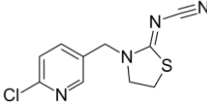
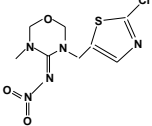
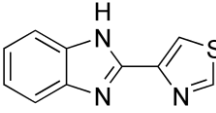












Compuesto/Uso	Estructura	Compuesto/Uso	Estructura
Malaoxon (MLX) Insecticida		Paraoxon Metil (PXON) Insecticida	
Metamidofos (MET) Insecticida		Paration- metil (PAR) Insecticida	
Metomil (MTL) Insecticida		Pendimetalina (PEN) Herbicida	
Monocrotofos (MON) Insecticida		Picloram (PIC) Herbicida	
Ometoato (OME) Insecticida		Pirimifos - metil (PIR) Insecticida	
Propanil (PROPA) Herbicida		Pirimetanil (PYR) Funguicida	
Propiconazol (PROPIL) Funguicida		Quinclorac (QUI) Herbicida	
Terbutrina (TER) Herbicida		Tiacloprid (THC) Insecticida	
Tiametoxan (THI) Insecticida		Tiabendazol (THB) Funguicida	

Tabla 2.5 Clasificación científica de las frutas tropicales incluidas en este trabajo.

Jerarquía	Lulo	Uchuva	Tamarillo	Maracuyá	Gulupa	Granadilla
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
División	<i>Angiospermae</i>	<i>Angiospermae</i>	<i>Angiospermae</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>	<i>Asteridae</i>	<i>Asteridae</i>	<i>Arquiclamidea</i>	<i>Dilleniidae</i>	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Solanales</i>	<i>Solanales</i>	<i>Solanales</i>	<i>Violales</i>	<i>Violales</i>	<i>Violales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanaceae</i>	<i>Passifloraceae</i>	<i>Passifloraceae</i>	<i>Passifloraceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>	<i>Solanoideae</i>	<i>Solanoideae</i>	<i>Passifloroideae</i>	<i>Passifloroideae</i>	<i>Passifloroideae</i>
Tribu	<i>Solaneae</i>	<i>Physaleae</i>	<i>Solaneae</i>	<i>Passifloreae</i>	<i>Passifloreae</i>	<i>Passifloreae</i>
Género	<i>Solanum</i>	<i>Physalis</i>	<i>Solanum</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Passiflora</i>
Especie	<i>S. quitoense</i>	<i>P. Peruviana</i> L.	<i>S. betaceum</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. pinnatistipula</i>	<i>P. ligularis</i>
Nombres comunes	Lulo, naranjilla, obando, nuquí coconilla.	Uvilla, tomatillo, tomate silvestre, alquequenje aguaymanto, capulí, physalis. Golden-berry	Tomate de yuca, tomate de árbol, sachatomate, chilito, tomate andino, tamarillo	Maracuyá, parcha, parchita chinola.	Gulupa, tintín Pasionaria, Purupuru.	Granada china, granada de moco, granadilla parchita, granadita, parcha dulce.
Fruta						

Jerarquía	Guayaba	Feijoa	Papaya	Pitahaya	Mangostán	Carambolo
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Angiospermae</i>	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>	<i>Rosidae</i>	-----	<i>Caryophyllidae</i>	-----	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Myrtales</i>	<i>Myrtales</i>	<i>Brassicales</i>	<i>Caryophyllales</i>	<i>Malpighiales</i>	<i>Oxalidaceae</i>
Familia	<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtaceae</i>	<i>Caricaceae</i>	<i>Cactaceae</i>	<i>Clusiaceae</i>	<i>Oxalidaceae</i>
Subfamilia	<i>Myrtoideae</i>	<i>Myrtoideae</i>	-----	<i>Cactoideae</i>	-----	-----
Tribu	<i>Myrteae</i>	<i>Myrteae</i>	-----	<i>Hylocereeae</i>	-----	-----
Género	<i>Psidium</i>	<i>Acca</i>	<i>Carica</i>	<i>Hylocereus</i>	<i>Garcinia</i>	<i>Averrhoa</i>
Especie	<i>Psidium guajava</i>	<i>A. sellowiana</i>	<i>Carica papaya</i>	<i>H. megalanthus</i>	<i>G. Mangostana</i> L.	<i>A. carambola</i> L.
Nombres Comunes	Guayaba, Arazá, Hurapo, Luma, Parcha, Piche, Sahuinto	Guayabo, freijoa, Guayaba chica, guayaba o guayabo del Brasil.	Papayo, papayón, mamón, melón papaya, lechosa, melón de árbol, fruta bomba.	Cardo ananás, Flor del cáliz, Pitaja, Pitaya, Pitayayá, fruta dragon, pitahaya amarilla.	Mangostino, Mangostinos, Mangostín, Mangosto, Jobo de la India, Mangosteno, Manzana de oro	Carambola, Carambolos, Tamarindo chino, Tamarindo culí, Árbol del pepino, Carambolera, Carambolero
Fruta						

Determinación de residuos de plaguicidas en frutas tropicales

Actualmente, existen numerosos MRM para plaguicidas en diferentes matrices de interés ambiental y alimentario. La mayoría de métodos recientes se basan en el uso de GC-MS/MS y LC-MS/MS con analizadores de tripe cuadrupolo, con una tendencia clara hacia el predominio de LC-MS/MS, por su mayor versatilidad y aplicabilidad para los plaguicidas actualmente utilizados (de polaridad media-alta), así como para sus metabolitos (Alder, 2006; Botitsi, 2011; Hernández 2013; Pihlström, 2007; Soler, 2008; Tadeo, 2000).

Sin embargo, son escasos los métodos publicados para frutas exóticas provenientes de países suramericanos, africanos y asiáticos. Por ello, existe interés en desarrollar metodologías analíticas multi-residuo para este tipo de productos. Idealmente, deberían ser rápidas, sensibles, reproducibles y estar debidamente validadas, para poder ser aplicadas para controlar el cumplimiento de los MRLs, con énfasis en aquellos plaguicidas más utilizados para la protección de estos cultivos.

Entre los trabajos publicados sobre frutas tropicales, destacan los de Ciscato y colaboradores sobre residuos de plaguicidas en frutas y verduras brasileñas en programas de vigilancia realizados desde 1994 hasta 2001 (Gebara, 2005) y en 2006-2007 (Ciscato, 2009). La extracción de las muestras se realizó aplicando el método alemán DFG S19 (Specht, 1992), basado en extracción con acetona, seguida de partición líquido- líquido con acetato de etilo y *clean up* con silica gel. La determinación se hizo mediante GC con detectores convencionales y LC- UV/VIS y detector de fluorescencia. Para la confirmación de posibles positivos, se usaron análisis adicionales mediante LC-MS/MS (QqQ). Las frutas analizadas fueron papaya, mango y guayaba.

En este mismo campo, el grupo de Banerjee y colaboradores, de la India, propuso dos métodos para la determinación de plaguicidas en frutas tropicales. El primero abordó la determinación de 87 plaguicidas en mango por LC-MS/MS con analizador de cuadrupolo-trampa iónica (Q-TRAP) (Banerjee, 2009), y el segundo se desarrolló para 50 plaguicidas en uva, granada y mango por GC-MS/MS con analizador de trampa iónica (Savant, 2010). El tratamiento de muestra fue similar en ambos métodos.

El grupo de Navickiene y colaboradores (Brasil) determinó siete plaguicidas en mango y papaya por GC-MS con analizador de cuadrupolo en modo SIM. La extracción de la muestra se

realizó mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) utilizando sílice como sorbente dispersante y acetato de etilo/diclorometano como disolvente (Navickiene, 2010).

Otros métodos relacionados con frutas tropicales hacen referencia a la determinación de residuos del fungicida azoxystrobin en mango mediante HPLC-UV, realizando extracción con ACN, partición líquido-líquido y posterior *clean up* con SPE (Sundravadana, 2008). Cabe destacar el estudio realizado por Hjorth y colaboradores, sobre frutas exportadas desde Suramérica, en el que se analizaron alrededor de 700 muestras. Los análisis se llevaron a cabo aplicando varios MRM basados en GC/LC con diferentes detectores, incluidos MS y MS/MS. Cabe destacar que los ditiocarbamatos y el cloromequat se analizaron por separado con detectores de ultravioleta y MS/MS. Los fungicidas post-cosecha tiabendazol e imazalil y el insecticida clorpirifos fueron los plaguicidas más frecuentemente detectados. Clorotalonil, dimetoato, tiacloprid, imidacloprid, metomilo, cypermethrin, lambda-cyhalotrin, propamocarb y ditiocarbamatos, se detectaron en papaya, mango y fruta de la pasión (Hjorth, 2011).

En Colombia (Medellín), se ha desarrollado recientemente un MRM en tomates (*Solanum lycopersicum*), tamarillos (*Solanum betaceum*) y goldenberries (*Physalis peruviana*) para 50 plaguicidas basado en extracción con QuEChERS y determinación mediante GC-MS (SIM). Las muestras de tomate analizadas dieron positivos para varios plaguicidas, como carbaril, carbofuran, diazinon, dimetoato, endosulfan alfa, beta y endosulfán y p'DDT (Ramírez, 2014).

También se ha realizado una comparación de metodologías oficiales basadas en QuEChERS (versión oficial AOAC y versión Europea CEN) para la determinación de residuos de 33 plaguicidas en frutas colombianas por GC-MS mediante inyección de grandes volúmenes (LVI) (España, 2014). La aplicación del método CEN proporcionó recuperaciones aceptables para todos los analitos. Por otro lado, el uso de (GCB) en la etapa de limpieza en el método AOAC no mejoró los resultados, especialmente para los plaguicidas de tipo planar como los hexaclorobenzenos (HCB) y clorpirifos. Con el método CEN, sin importar el tipo de limpieza, incluso usando GCB, se obtuvieron recuperaciones satisfactorias.

----- 0 -----

A la luz de la bibliografía existente, se deduce que, aunque existen muchos métodos multi-residuo para productos vegetales (en los últimos años basados principalmente en GC-MS/MS y LC-MS/MS), hay muy pocos métodos publicados específicamente dirigidos a frutas

tropicales. Además, la mayoría de los existentes se basan en el uso de GC-MS y LC con detectores convencionales. Existe una evidente carencia de metodología basada en LC-MS/MS para frutas tropicales, la cual pretende solventarse, en cierta medida, con los trabajos realizados en esta Tesis.

Por otra parte, apenas existe información sobre el ME que puede afectar a la cuantificación y por tanto a los resultados reportados en matrices de frutas tropicales cuando se aplican métodos LC-MS/MS. Únicamente pueden encontrarse algunos datos en publicaciones sobre MRM en los que se ha trabajado con diversas matrices vegetales, algunas de las cuales son frutas tropicales (Banerjee, 2009; Caldas, 2011; Capobianco, 2005; España, 2014; Freitas, 2009; Navickiene, 2010; Savant, 2010).

Aun siendo escasa, las frutas tropicales sobre las que se dispone más información sobre métodos analíticos son el mango, tamarillo, uchuva, pitahaya, granadilla y papaya (Ciscato, 2009; Crnogorac, 2008; Dorea, 1999; Gebara, 2005; Hjorth, 2011; Jardim, 2014; Navickiene, 2005; Ramírez, 2014).

En este capítulo de la Tesis Doctoral, se presenta metodología analítica desarrollada para la determinación multi-residual de plaguicidas y metabolitos en frutas tropicales. El trabajo realizado se ha plasmado en dos artículos científicos centrados en frutas tropicales de Colombia, seleccionando las de mayor valor comercial tanto en el mercado interno como internacional. Los plaguicidas objeto de estudio se han seleccionado entre los de mayor aplicación en Colombia, considerándose únicamente aquellos que pueden ser determinados en métodos basados en LC-MS/MS. Han quedado fuera del estudio, por tanto, plaguicidas típicamente analizados por GC, así como algunos compuestos que requieren métodos específicos por sus especiales características físico-químicas (generalmente, por su elevada polaridad), como los ditiocarbamatos, quats o glifosato. Este último, debido a su enorme uso e interés analítico por la especial dificultad en su determinación, ha sido objeto de estudio separado en esta Tesis (Capítulo 3).

El primer método (**artículo científico 1**) se ha desarrollado para más de 30 plaguicidas, de diferentes familias y propiedades físico-químicas, en siete frutas tropicales (uchuva, maracuya, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya y granadilla), empleándose una sencilla extracción con ACN en ultraturrax. En el segundo (**artículo científico 2**), se ha ampliado el número de matrices tropicales hasta doce, añadiendo cinco más de frecuente consumo en

Colombia (lulo, carambolo, feijoa, mangostan y guayaba). El número de compuestos estudiados se ha reducido a 20, considerando los más detectados en el primer estudio e incluyendo algunos metabolitos que se consideran en la definición de residuo. En este segundo caso, la extracción se ha basado en el procedimiento QuEChERS versión citrato-buffer (CEN Standard Method EN 15662) (CEN, 2008). En ambos trabajos se ha prestado una atención especial al estudio del ME y a posibles estrategias para una corrección sencilla, de fácil aplicación en laboratorios de rutina.

2.1.2 Artículo Científico 1

Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry

A.M. Botero-Coy, J. M. Marín, M. Ibáñez, J. V. Sancho, F. Hernández*

Anal Bioanal Chem (2012) 402:2287–2300

Anal Bioanal Chem (2012) 402:2287–2300
DOI 10.1007/s00216-011-5431-3

ORIGINAL PAPER

Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry

A. M. Botero-Coy · J. M. Marín · M. Ibáñez ·
J. V. Sancho · F. HernándezReceived: 4 July 2011 / Revised: 15 September 2011 / Accepted: 20 September 2011 / Published online: 8 October 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Monitoring pesticide residues in tropical fruits is of great interest for many countries, e.g., from South America, that base an important part of their economy on the exportation of these products. In this work, a LC-MS/MS multi-residue method using a triple quadrupole analyzer has been developed for around 30 pesticides in seven Colombian tropical fruits of high commercial value for domestic and international markets (uchuva, tamarillo, granadilla, gulupa, maracuya, papaya, and pithaya). After sample extraction with acetonitrile, an aliquot of the extract was diluted with water and directly injected into the HPLC-MS/MS system (electrospray interface) without any cleanup step. The formation of sodium adducts—of poor fragmentation—was minimized using 0.1% formic acid in the mobile phase, which favored the formation of the protonated molecule. However, the addition of ammonium acetate made the formation of the ammonium adducts in some particular cases possible, avoiding the presence of the sodium adducts. The highest sensitivity was observed in positive electrospray ionization for the wide majority of pesticides, with a few exceptions for acidic compounds that gave better response in the negative mode (e.g., 2,4-D, fluazinan). Thus, simultaneous acquisition on the positive/negative mode was applied. Two MS/MS transitions were acquired for each compound to ensure a reliable quantification and identification of the compounds detected in samples, although for malathion a third transition was

acquired due to the presence of interfering isobaric compounds in the sample extracts. A detailed study of matrix effects was made by a comparison of standards in solvent and in matrix. Both ionization suppression and ionization enhancement were observed depending on the analyte/matrix combination tested. Correction of matrix effects was made by the application of calibration in matrix. Three matrices were selected (uchuva, maracuya, gulupa) to perform matrix calibration in the analysis of all seven fruit varieties studied. The method was validated by recovery experiments in samples spiked at two levels (0.05 and 0.5 mg/kg). The data were satisfactory for the wide majority of analyte/matrix combinations, with most recoveries between 70% and 110% and the RSD below 15%. Several samples collected from the market were finally analyzed. Positive findings were confirmed by evaluating the experimental Q/q ratios and retention times, and comparing them with those of reference standards.

Keywords Tropical fruits · LC-MS/MS · Pesticide residue analysis · Multi-residue method · Matrix effects · Triple quadrupole

Introduction

The determination of pesticide residues in tropical fruits is of great interest for many countries, especially those from South America, that base an important part of their economy on the exportation of fruits and vegetables, mainly tropical fruits. Colombia is the ninth supplier of exotic fruits in the world. The main fruits exported in the last years were uchuva, tamarillo (tomate de árbol), tamarindo, and granadilla. Colombia is also an important supplier of pithaya, gulupa, and baby banana. The main

Published in the special issue *Mass Spectrometry in Spain* with guest editors José Miguel Vadillo and Damia Barcelo.

A. M. Botero-Coy · J. M. Marín · M. Ibáñez · J. V. Sancho ·
F. Hernández (✉)
Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I,
12071 Castellón, Spain
e-mail: felix.hernandez@qfa.uji.es

Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Anal Bioanal Chem 2012, 402:2287-2300

A.M. Botero-Coy, J. M. Marín, M. Ibáñez, J. V. Sancho, F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071, Castellon, Spain

ABSTRACT

Monitoring pesticide residues in tropical fruits is of great interest for many countries, e.g., from South America, that base an important part of their economy on the exportation of these products. In this work, a LC-MS/MS multi-residue method using a triple quadrupole analyzer has been developed for around 30 pesticides in seven Colombian tropical fruits of high commercial value for domestic and international markets (uchuva, tamarillo, granadilla, gulupa, maracuya, papaya, and pitahaya). After sample extraction with acetonitrile, an aliquot of the extract was diluted with water and directly injected into the HPLC-MS/MS system (electrospray interface) without any cleanup step. The formation of sodium adducts of poor fragmentation was minimized using 0.1% formic acid in the mobile phase, which favored the formation of the protonated molecule. However, the addition of ammonium acetate made the formation of the ammonium adducts in some particular cases possible, avoiding the presence of the sodium adducts. The highest sensitivity was observed in positive electrospray ionization for the wide majority of pesticides, with a few exceptions for acidic compounds that gave better response in the negative mode (e.g., 2,4-D, fluazinam). Thus, simultaneous acquisition on the positive/negative mode was applied. Two MS/MS transitions were acquired for each compound to ensure a reliable quantification and identification of the compounds detected in samples, although for malathion a third transition was acquired due to the presence of interfering isobaric compounds in the sample extracts. A detailed study of matrix effects was made by a comparison of standards in solvent and in matrix. Both ionization suppression and ionization enhancement were observed depending on the analyte/matrix combination tested. Correction of matrix effects was made by the application of calibration in matrix. Three matrices were selected (uchuva, maracuya,

gulupa) to perform matrix calibration in the analysis of all seven fruit varieties studied. The method was validated by recovery experiments in samples spiked at two levels (0.05 and 0.5 mg/kg). The data were satisfactory for the wide majority of analyte/matrix combinations, with most recoveries between 70% and 110% and the RSD below 15%. Several samples collected from the market were finally analyzed. Positive findings were confirmed by evaluating the experimental Q/q ratios and retention times, and comparing them with those of reference standards.

Keywords: Tropical fruits, LC-MS/MS, Pesticide residue analysis, Multi-residue method, Matrix effects, Triple quadrupole.

INTRODUCTION

The determination of pesticide residues in tropical fruits is of great interest for many countries, especially those from South America, that base an important part of their economy on the exportation of fruits and vegetables, mainly tropical fruits. Colombia is the ninth supplier of exotic fruits in the world. The main fruits exported in the last years were uchuva, tamarillo (tomate de árbol), tamarindo, and granadilla. Colombia is also an important supplier of pithaya, gulupa, and baby banana. The main destinations of these products are the Netherlands, Germany, France, Belgium, and Spain because of consumer preferences. A notable increase has been observed from 233 million potential consumers in 2002 to 1,200 million in 2010 [1]. In addition, Colombia is the world's first producer of uchuva (*Physalis peruviana*), followed by South Africa. Colombian fruit is characterized by having a better color and higher sugar content, which makes it more attractive to foreign markets.

Restrictive legislation around the world is applied to tropical fruits, which have to accomplish the maximum residue levels (MRLs) allowed in, e.g., the European Union or USA, which are among the most important markets. Consequently, a strict control is required on tropical fruits to accurately measure the concentration levels of pesticides, with emphasis in those that are more widely used for crop protection.

The use of multi-residue methods (MRMs) is compulsory at present in the field of pesticide residue analysis (PRA) due to the need of monitoring a large number of pesticides. There has been a rapid growth of MRMs based on the use of LC-MS/MS in the last years as most of

pesticides applied at present are more easily and efficiently determined by this technique [2]. LC-MS/MS with triple quadrupole is nowadays the technique of choice for most laboratories dealing with PRA, as the most recent literature illustrates [3–8].

Although the use of GC-MS is still required for (semi) volatile, non-polar pesticides, like organochlorine or pyrethroids, modern pesticides are mostly of medium/high polarity and fit better with LC-based techniques. In any case, the combined use of GC-MS/MS and LC-MS/MS appears as the most efficient approach nowadays for large scope screening/determination of pesticides, from non- polar/volatile to polar/non-volatile compounds [9–11].

A rapid overview of the scientific literature shows that there are many MRMs for pesticides in fruits and vegetables published in the last decade. However, only a few can be found dealing specifically with tropical fruits. Therefore, there is a general lack of methodology developed and validated for this kind of fruits. Ciscato and co- workers have reported information on pesticide residues in Brazilian fruits and vegetables in monitoring programs performed from 1994 to 2001 [12] and from 2006 to 2007 [13]. The analytical multi-residue methodology applied included several steps with much sample manipulation. It was based on the DFG S19 multi-residue method [14], which used extraction with acetone followed by liquid– liquid partitioning and gel permeation chromatography cleanup. An additional cleanup step with silica gel was also applied when necessary. Analysis was made by GC with a variety of conventional detectors and by HPLC with UV/VIS and fluorescence detectors. Confirmation of positive findings was made by LC-MS/MS. The tropical fruits analyzed were papaya, mango, and guava.

Mango seems to be the tropical fruit most widely studied, with several papers devoted specifically to it. Banerjee and co-workers have recently proposed two separate methods for the determination of 87 pesticides in mango by LC-MS/MS with a QTRAP analyzer [15] and for the determination of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by GC-MS/MS with an ion trap analyzer [16]. The sample treatment was similar in both methods: after extraction with ethyl acetate, the extract was cleaned up by dispersive solid phase extraction (SPE) with a combination of primary–secondary amine (PSA) and graphitized carbon black (GCB). Direct analysis without cleanup resulted in a significant suppression for the majority of compounds using LC-MS/MS analysis with electrospray ionization interface. However, the combination of PSA + GCB cleanup minimized matrix effects, and the signals in the cleaned up extracts were

nearly equivalent to the corresponding standards in the solvent. In another work, seven pesticides (trichlorfon, pyrimethanyl, parathion methyl, tetraconazole, thiabendazole, imazalil, and tebuconazole) were determined in mango and papaya by GC-MS under selected ion monitoring mode [17]. Sample extraction was performed by matrix solid phase dispersion using silica as the solid dispersant sorbent and ethyl acetate dichloromethane as the eluting solvent. Moreover, a single residue method was developed for the determination of residues of the fungicide azoxystrobin in mango based on the extraction of samples with acetonitrile, cleanup with both liquid-liquid partitioning and SPE, and HPLC-UV analysis [18].

The results on pesticide residues in fruits and vegetables from South America from a collaborative project between five Nordic countries have been recently reported [19]. Around 700 samples of 46 different fruits and vegetables from eight South American countries were collected in 2007. Analyses were performed by a variety of multi-residue methods based on GC with electron capture detection, nitrogen phosphorus detection, MS, or MS/MS; LC-MS/MS; and single residue methods for dithiocarbamates and chlormequat. The post-harvest fungicides thiabendazole and imazalil, and the insecticide chlorpyrifos were the pesticides most frequently found. The pesticides detected in tropical fruits, like papaya, mango, and passion fruit, were chlorothalonil, dimethoate, thiacloprid, imidacloprid, methomyl, cypermethrin, lambda cyhalotrin, propamocarb, and dithiocarbamates. The MRLs for these analyte/matrix combinations were all set at the analytical limit of quantification, mostly 0.05 mg/kg

In this article, we have developed an analytical methodology for the LC-MS/MS residue determination of around 30 pesticides widely used in Colombia in tropical fruit samples. Seven tropical matrices have been selected among the most important for exportation: uchuva (*P. peruviana*), maracuya (*Passiflora edulis*), pithaya (*Hylocereus undatus*), tamarillo (*Cyphomandra betacea*), gulupa (*Passiflora pinnatistipula*), papaya (*Carica papaya*), and granadilla (*Passiflora ligularis*). These tropical fruits have different tastes and normally higher sugar content than European fruits. With a few exceptions, tropical fruits have low protein and fat content, are a high source of vitamins (e.g., vitamin C), and are rich in carotenes and antioxidant components [20]. For compliance of MRLs, the tropical fruits selected in this article can be included in the following EU group products: (1) maracuya, gulupa and granadilla within miscellaneous fruits, inedible peel, small: passion fruit; (2) papaya and pithaya within miscellaneous fruits, inedible peel, large; (3) uchuva and tamarillo

within fruiting vegetables, solanacea The objective of our work was to develop a rapid method with little sample manipulation (the philosophy was “extract, dilute, and inject”) for tropical fruits of large domestic consumption and high commercial value in Colombia. Special attention has been paid to matrix effects, which can greatly affect the quantification of analytes. After method development and validation, several samples collected from local markets were analyzed to test the applicability of the method for both quantitation and confirmation purposes.

EXPERIMENTAL

Reagents and chemicals

Pesticide reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade methanol, HPLC-grade acetonitrile, and acetone for residue analysis were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). HPLC- grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Formic acid (HCOOH, content >98%) and ammonium acetate (NH₄Ac, reagent grade) were supplied by Scharlau.

Stock standard solutions were prepared dissolving 50 mg, accurately weighted, in 100 mL of acetone, obtaining a final concentration of around 500 mg/L. For LC-MS analysis, the stock solutions were diluted with methanol to prepare individual solutions of around 50 mg/ L. From these, mixed solutions of seven to eight pesticides were prepared by diluting with methanol to obtain a final concentration of 5 mg/L. Working mixed solutions of all pesticides were prepared from the 5-mg/L solutions by dilution with water.

Mixed solutions of 10 and 1 mg/L in acetone were used for sample fortification along recovery experiments. In order to remove solid particles, two 0.45- μ m syringe filters were tested (nylon 25 mm from Supelco, Bellefonte, PA, USA; cellulose acetate 30 mm from GE Water & Process Technologies, Herentals, Belgium).

Liquid chromatography/mass spectrometry

A Waters Alliance 2795 LC system (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface. The LC separation was performed using an Atlantis dC18 column (5 μm , 2.1×100 mm; Waters) at a flow rate of 0.2 mL/min. The mobile phase used was a water (1 mM NH_4Ac)/methanol (0.01% HCOOH , 0.1 mM NH_4Ac) gradient where the percentages of methanol were: 0 min, 30%; 5 min, 90%; 15 min, 90%; 17 min, 30%; and 19 min, 30%.

The drying gas as well as the nebulizing gas was nitrogen-generated from pressurized air in a N2 LC-MS (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). The desolvation gas and cone gas flows were adjusted to 600 and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump, directly connected to the interface. For operation in MS/MS mode, the collision gas was argon (99.995%; Praxair, Valencia, Spain) at a pressure of 2×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of -3 kV in negative ionization mode and 3.5 kV in positive mode were used.

The interface temperature was set to 350 $^{\circ}\text{C}$ and the source temperature to 120 $^{\circ}\text{C}$. Dwell times of 0.1 s were chosen. Two solvent delays were selected to give an additional cleanup using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.4.1 software, the first one from 0 to 1.5 min and the second one from 13 to 19 min. The application manager TargetLynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

A Waters Acquity UPLC system was interfaced to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration TOF mass spectrometer (Q-TOF Premier, Waters Micromass, Manchester, UK) using an orthogonal Z-spray-(electrospray ionization) ESI interface operating in positive ion mode. The ultra high-pressure liquid chromatography (UHPLC) separation was performed using an Acquity UPLC BEH C18, 1.7- μm particle size analytical column, 150×2.1 mm (Waters), at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$.

For MS^E experiments, two acquisition functions with different collision energies were created—the first one, the low-energy function (LE), selecting a collision energy of 4 eV, and the second one, the high-energy (HE) function, with a collision energy ramp ranging from 15 to 40 eV — in order to obtain a greater range of fragment ions. For more details on instrumental conditions and LC-QTOF-MS analysis, see [21].

Recommended procedure

A homogenized sample (20 g) was accurately weighed (precision 0.1 mg) and extracted with 50 mL acetonitrile in an Ultra-Turrax T25 high-speed blender (Janke & Kunkel Ika-Labortechnik, Staufen, Germany) for 2 min at 8,000 rpm. The extraction vessel and rod were washed with 10 mL acetonitrile. Then, it was filtered under vacuum in a Buchner and transferred to a 100-mL volumetric flask; the final volume was adjusted with water (solution A, acetonitrile/water 60:40).

A 2.5-mL aliquot of solution A was taken and diluted with water to 10 mL in a volumetric flask (final extract 0.05 g/mL in acetonitrile/water 15:85, solution B). Then, 20 μ L of the final extract was directly injected in the LC-MS/MS system. Calibration was performed using matrix-matched standards, prepared from a blank sample extract as follows: 1 mL of the corresponding mixed standard in methanol/water (between 10 and 1,000 μ g/L) was added to a 2.5-mL blank sample aliquot (solution A) and diluted with water to 10 mL.

Fortification of samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of 1 or 10 μ g/mL standard mixture solutions in acetone to 20 g homogenized blank sample in order to yield fortification levels of 0.05 or 0.5 mg/kg, respectively. The fortified samples were aged for 1 h prior to extraction.

Validation study

Validation of the method was made based on the European Union SANCO guidelines [22]. Precision (repeatability, in terms of %RSD) and accuracy (percentage recoveries) were estimated by recovery experiments in the seven tropical fruits selected at two fortification levels, 0.05 and 0.5 mg/kg (analyzed in quintuplicate). The limit of quantification (LOQ) objective was set as the lowest concentration that was validated in fortified samples with satisfactory precision (RSD < 20%) and recovery (between 70% and 120%). The specificity of the method was evaluated using Q transition by analyzing a procedure blank a processed blank sample and a processed blank sample spiked at the LOQ level. The acceptance criteria was that both, procedure and sample blanks, did not present any relevant chromatographic peak at the transitions selected. The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration for which a signal-to-noise ratio of 3 is obtained, was estimated from

chromatograms of blank sample extracts (solution B) fortified between 1 and 10 ng/mL depending on the sensitivity reached for the compound selected.

Confirmation of the identity of the compound in samples was carried out by acquisition of, at least, two MS/MS transitions and the compliance of the Q/q ratio between samples and reference standards (where Q is the quantification transition and q is the confirmation transition). The maximum tolerances accepted were based on guideline SANCO/10684/2009 [22] as well as on European Decision 2002/657 [23]. The agreement in retention time was also required, with maximum deviation of 2.5%.

RESULTS AND DISCUSSION

MS optimization

All spectra were obtained by infusion of 2.5 mg/L standard solutions in methanol/water (50:50, v/v) at a flow rate of 10 μ L/min. The highest sensitivity was observed in positive ESI, with a few exceptions for acidic compounds that gave a better response in negative mode (e.g., 2,4-D, fluazinam). The full-scan spectrum showed the most abundant ions for each compound, which typically corresponded to the protonated molecule. Different cone voltages, between 5 and 50 V, were tested to increase the abundance of the $[M+H]^+$ ion, selecting the values shown in Table 1.

The formation of sodium adducts, which are poorly fragmented and not much recommendable in MS/MS-based methods, was minimized by adding 0.1% formic acid, favoring in this way the formation of the protonated molecule. Besides, the addition of ammonium acetate made the formation of the ammonium adducts in some particular cases possible, avoiding the presence of the sodium adduct (e.g., monocrotopos, clomazone, fludioxonil). Under the experimental conditions finally selected, using formic acid and ammonium acetate as additives in the mobile phase, all precursor ions selected in positive ESI corresponded to $[M+H]^+$, with the only exception of fludioxonil in which the precursor ion was $[M+NH_4]^+$. Figure 1 shows two illustrative examples of the effect of formic acid and ammonium acetate on the abundance of sodium adducts, as well as $[M+H]^+$ and $[M+NH_4]^+$ ions.

Once the most abundant precursor ion was selected, MS/MS experiments were performed at different collision energies by isolating the precursor ion in the first quadrupole and promoting its fragmentation in the collision cell to give the corresponding product ions. From the product ion spectra, two transitions were selected for each compound to work under selected reaction monitoring (SRM) mode. The most sensitive transition (Q) was used for quantification purposes, while the second one was used for confirmation (q). The only exception was malathion, where the second most sensitive transition ($331 > 99$) was discarded for confirmation purposes due to an interfering compound observed at nearly the same retention time in several matrices studied. Therefore, another product ion, less sensitive but more selective, was chosen for confirmation ($331 > 125$, Table 1).

The presence of atoms with characteristic and abundant isotope distribution (e.g., Cl) in the chemical structure of several analytes allowed, in some particular cases, taking profit of the isotopic pattern to improve confirmation sensitivity as well as to increase the number of identification points [23]. As an illustrative example, Fig. 2 shows the product ion spectra for two selected pesticides, atrazine and imidacloprid, both containing one Cl. The precursor ion corresponding to ^{37}Cl was used for the confirmatory transition for atrazine, ($Q = 216 > 174$, $q = 218 > 176$), while this was not the case for imidacloprid ($Q = 256 > 175$, $q = 256 > 209$). Thus, selecting the precursor and product ions corresponding to Cl^{37} favored the sensitivity of the second transition in the case of atrazine, while for imidacloprid, the sensitivity of the confirmation transition was better by using the precursor ion corresponding to Cl^{35} .

Table 1. MS/MS optimized conditions for selected compounds.

No.	Compound	RT (min)	Mode	Precursor ion (m/z) ^a	Cone (V)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)	Q/q ratio
1	Methamidophos (MET)	2.23	ES+	142.0	25	15	93.8 111.9	3.44
2	Picloram (PIC)	3.45	ES+	241.0 243.0	20	20 20	195.0 197.0	1.11
3	Methomyl (MTL)	4.16	ES+	163.1	15	10 10	87.8 105.8	1.25
4	Thiametoxam (THI)	4.39	ES+	292.0	20	15 20	211.2 181.0	1.78
5	Monocrotophos (MON)	4.80	ES+	224.0	20	15 10	127.0 193.0	1.36
6	Imidacloprid (IMI)	5.59	ES+	256.0	20	20 20	175.0 209.0	1.04
7	Quinclorac (QUI)	6.39	ES+	242.0	20	15 35	224.0 161.0	1.27
8	Dimethoate (DIM)	6.10	ES+	230.1	15	10 20	199.1 124.8	1.36
9	Carbendazim (CAR)	6.03	ES+	192.1	25	15 30	160.0 131.9	4.83
10	Carbofuran (CRB)	7.46	ES+	222.2	20	10 20	165.1 122.9	1.26
11	2,4 D (2,4D)	8.37	ES-	219.0 221.0	20	15 15	160.9 162.9	1.52
12	Atrazine (ATR)	8.25	ES+	216.0 218.0	30	20 20	174.0 176.0	3.11
13	Diuron (DIU)	8.36	ES+	233.1 235.2	30	15 15	71.5 71.6	1.77
14	Azoxystrobin (AZO)	8.44	ES+	404.1	25	15 25	372.0 344.0	2.78
15	Clomazone (CLO)	8.47	ES+	240.2 242.2	30	20 20	124.9 126.9	3.08
16	Ametryn (AME)	8.55	ES+	228.0	30	20 25	186.0 96.0	3.77
17	Parathion- methyl (PAR)	8.66	ES+	264.1	30	20 15	124.9 250.2	2.66
18	Pyrimethanil (PYR)	8.75	ES+	200.2	45	25 25	82.0 106.2	12.92
19	Fludioxonil (FLU)	8.77	ES+	266.0 ^a	15	35 25	158.0 185.0	1.69
20	Malathion (MAL)	8.81	ES+	331.0	20	15 25	127.0 125.0	3.56
21	Propanil (PROPA)	8.81	ES+	218.1 220.1	35	15 15	161.9 164.0	1.50
22	Terbutryn (TER)	9.06	ES+	242.1	30	20 25	186.0 91.0	6.60
23	Propiconazole (PROPIL)	9.51	ES+	342.0 344.0	30	25 25	159.0 161.0	1.54
24	Cyprodinil (CYP)	9.51	ES+	226.0	45	35 25	93.0 108.0	1.03
25	Pirimiphos methyl (PIR)	9.76	ES+	306.2	35	30 20	107.9 164.1	1.05
26	Fluazinam (FLU)	10.25	ES-	462.8 464.8	25	20 20	416.1 418.0	1.42
27	Butachlor (BUT)	10.67	ES+	312.0	15	25 10	238.0 162.0	1.06

Table 1. (continued) MS/MS optimized conditions for selected compounds.

No.	Compound	RT (min)	Mode	Precursor ion (m/z) ^a	Cone (V)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)	Q/q ratio
28	Chlorpyrifos (CHLOR)	10.86	ES+	350.0 352.0	25	20 20	198.0 200.0	1.03
29	Pendimethalin (PEN)	11.09	ES+	282.0	15	10 20	212.0 194.0	6.57

^a All precursor ions corresponded to $[M+H]^+$, with the exception of fludioxonil which was $[M+NH_4]^+$

Chromatographic conditions

Two analytical columns were tested in this work, Sunfire C18 (5 μ m, 2.1 \times 100 mm) and Atlantis dC18 (5 μ m, 2.1 \times 100 mm), using as mobile phase MeOH/water under different gradient conditions at a flow rate of 0.2 mL/min. The effect of two modifiers (formic acid and ammonium acetate) in the mobile phase was also checked on the chromatographic separation based on the behavior observed in the MS optimization step. This study was made using mixed standard solutions with all pesticides at 50 μ g/L. Under the final conditions selected, solutions of matrix- matched standards at 50 μ g/L were also injected.

Due to the presence of rather polar compounds, the initial percentage of organic modifier (methanol in this case) started at 5% in order to improve the retention for these analytes. However, excessive band broadening was observed for some of them, and it was found necessary to increase the initial content of methanol. Starting the gradient with 30% MeOH led to satisfactory retention and peak shape for nearly all analytes. Under these conditions, acidic analytes like picloram or 2,4-D showed split peaks in the Sunfire column, possibly due to the higher level of residual silanol groups that remained in this column in relation to the Atlantis one. Therefore, we selected the Atlantis column to perform this study. Despite increasing the organic modifier percentage, the acidic analytes eluted early, even unretained. To solve this problem, formic acid was added to MeOH in order to increase their retention. The addition of formic acid to the aqueous phase was also tested, but it did not produce a significant improvement; therefore, formic acid was added only to the organic methanolic phase.

The next experiments were conducted using NH_4Ac 0.1 mM in both the organic and aqueous phases due to the beneficial effects observed for this modifier during the MS optimization step. Several percentages of ammonium acetate (0.1–2 mM) were tested in the aqueous phase. The use of 1 mM was selected as a compromise for all compounds, between satisfactory peak shape and sensitivity. The chromatographic conditions finally selected for the Atlantis dC18 column were: mobile phase MeOH (0.1 mM NH_4Ac , 0.01% HCOOH)/ H_2O (1 mM NH_4Ac), with a gradient where the percentage of MeOH changed as follows: 0 min, 30%; 5 min, 90%; 15 min, 90%; 17 min, 30%; 18 min, 30%. Under these conditions, the compounds eluted as shown in Table 1, with retention times between 2.23 min (methamidophos) and 11.09 min (pendimethalin).

The two SRM transitions per compound were distributed in individual functions in order to achieve an adequate number of points per chromatographic peak. The chromatographic behavior of pesticides was rather similar for all tropical fruit matrices tested.

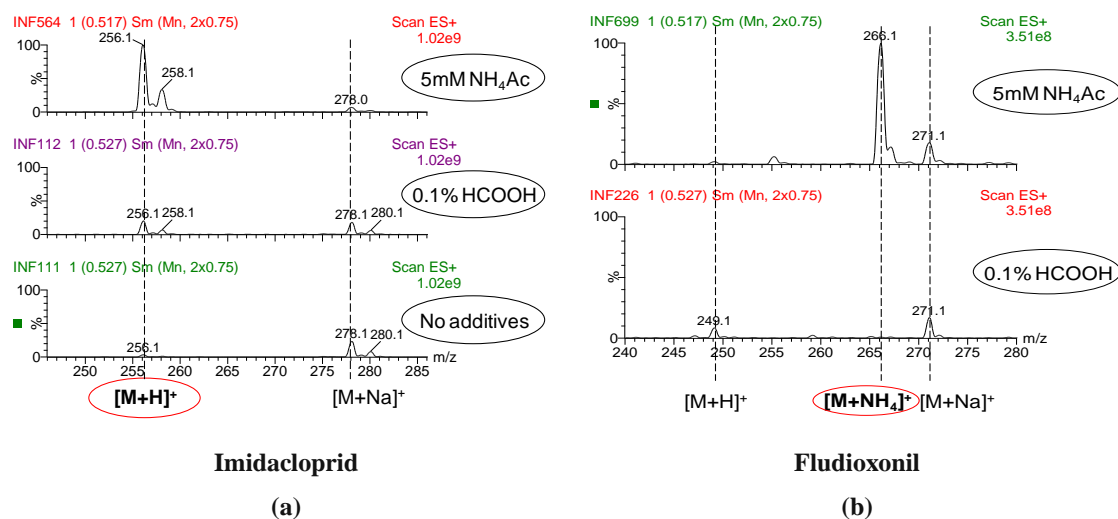


Fig. 1 Effect of ammonium acetate and formic acid on full-scan mass spectra of imidacloprid (a) and fludioxonil (b) (infusion of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solution in methanol/water 50:50)

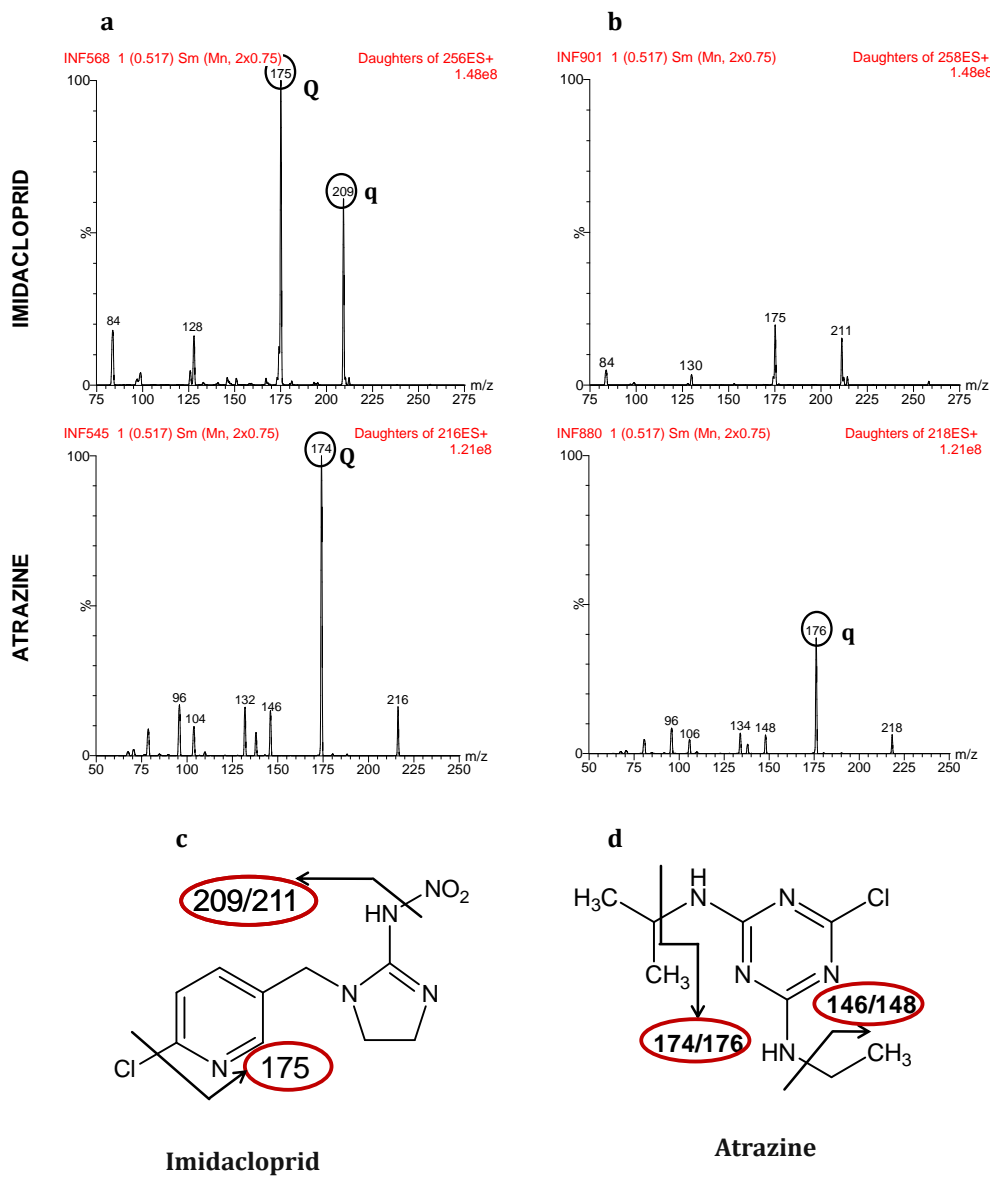


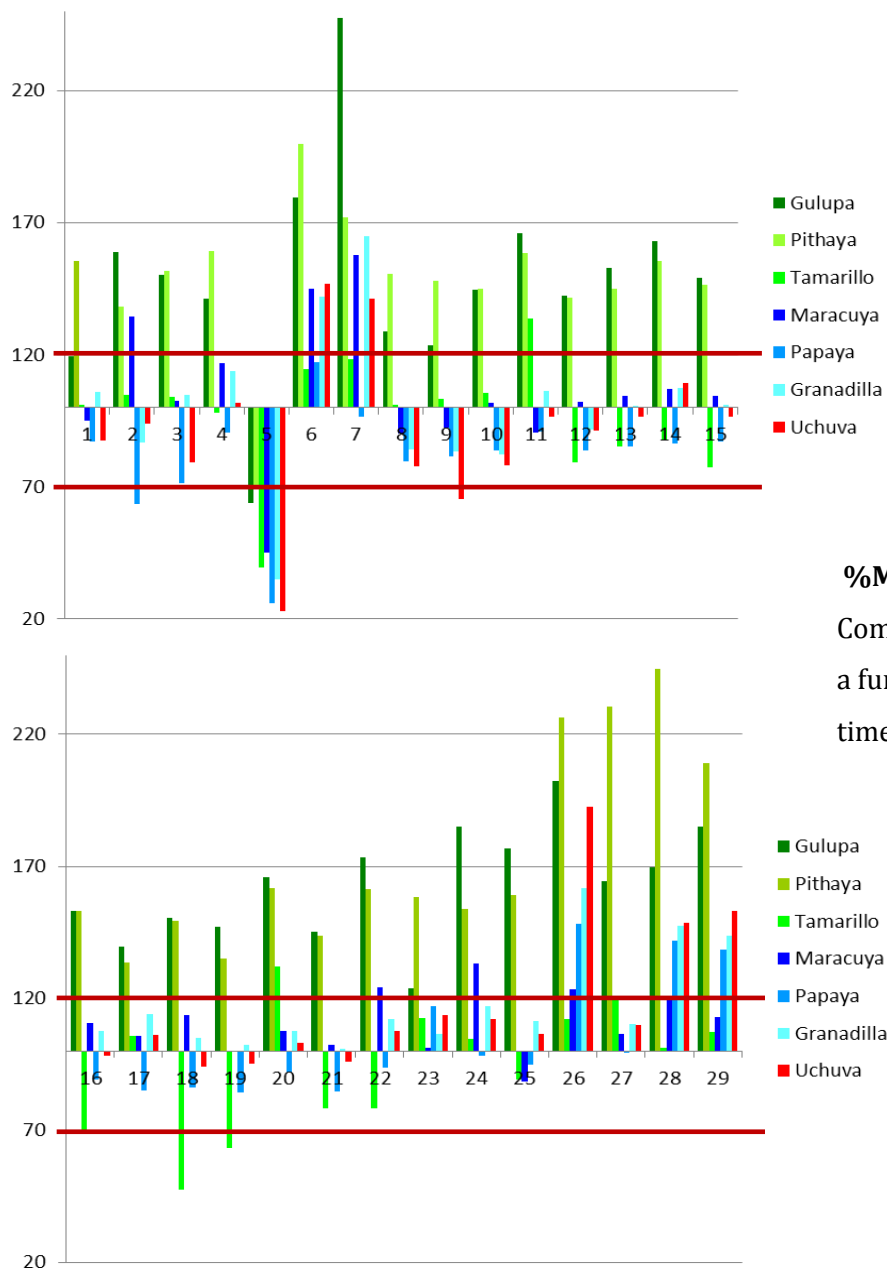
Fig. 2 Product ion spectra of imidacloprid and atrazine at 20 eV, precursor ion with ^{35}Cl (a) and precursor ion with ^{37}Cl (b). Fragmentation proposed for imidacloprid (c) and atrazine (d)

Matrix effects

A detailed study of matrix effects was made by a comparison of standards in solvent and in matrix. Both ionization suppression and enhancement were observed depending on the analyte/matrix combination considered (Fig. 3). Matrix effect (%ME) was calculated as the average response of the analyte in matrix divided by the average response in solvent using standards at a concentration of 25 ng/mL ($n = 3$). Thus, a value of 100% means that no matrix effect is present. No significant matrix effects were considered to be present when the values ranged between 70% and 120%. Maracuya, papaya, and granadilla (blue-based colors) together with uchuva (red color) were the tropical fruits that produced, in general, lower matrix effects. With the exception of monocrotophos (compound number 5, affected by strong ionization suppression), imidacloprid (6), quinclorac (7), and the last eluting fluazinam (26), chlorpyrifos (28), and pendimethalin (29, all these showing ionization enhancement), no relevant matrix effects were observed for these four fruit matrices. Gulupa and pithaya (green-based colors) showed similar behavior with regard to the matrix effects, and in less extent tamarillo. In general, ionization enhancement was observed for most of the analytes in these three matrices. A particular case was monocrotophos, for which strong ionization suppression was observed, with average ME below 70%. Oppositely, imidacloprid (6) and quinclorac (7), and the last eluting compounds fluazinam (26), butachlor (27), chlorpyrifos (28), and pendimethalin (29) were affected by a notable ionization enhancement.

As is already well known, the most frequent approach to compensate for matrix effects is the use of isotope-labeled internal standards (ILIS) or the use of matrix-matched standards calibration. In a MRM for around 30 pesticides, the use of ILIS is not much realistic due to the high cost and the unavailability of commercial ILIS for some analytes. Therefore, we selected calibration in matrix for matrix effects correction. Considering the behavior observed for the tropical fruits under study, they were divided into three groups to perform matrix-matched standards calibration: (1) gulupa, pithaya, and tamarillo were analyzed using matrix-matched calibration in gulupa; (2) maracuya, papaya, and granadilla were analyzed using calibration in maracuya; and (3) uchuva was analyzed with its own calibration in matrix.

Fig. 3 Absolute matrix effect (%ME) calculated for each analyte (n = 3) by a comparison of its response in matrix (X, extract fortified at 25 ng/mL) and in solvent (Y, standards mixture at 25 ng/mL).



$$\%ME = (X/Y) \times 100.$$

Compounds are numbered as a function of their retention time (see Table 1)

Method validation

Before starting the validation of the method, we tested the effect of two types of syringe filters to know whether the filtration of sample extracts leads to pesticide losses. To this aim, cellulose and nylon filters were used. Standard solutions in matrix (uchuva, maracuya) - final blank extracts (solution B) - at 20 and 50 ng/mL were injected into the LC-MS/MS system before and after filtration. Nylon filtration seemed slightly better than cellulose for the late-eluting compounds, especially in uchuva extracts. Nevertheless, five pesticides (clomazone, fludioxonil, fluazinam, butachlor, chlorpyrifos, pendimetalin) were still retained in this filter, misadvising its use. For maracuya extracts, cellulose filtration was in general better than nylon, but unacceptable losses were also observed for almost the same compounds (parathion-methyl, fludioxonil, fluazinam, butachlor, chlorpyrifos, and pendimetalin). Therefore, the filtration step was discarded due to the pesticide losses observed in both filter types, despite that the chromatographic column life could be reduced.

The optimized method described was validated using the SANCO guideline [22]. Linearity was studied by injecting (in triplicate) standards in matrix (maracuya, gulupa, uchuva) at eight different concentrations, in the range 1–100 ng/mL (equivalent to 0.02–2 mg/kg in sample). In general, satisfactory linearity, with correlation coefficients higher than 0.99 and residuals lower than 30%, was observed for the vast majority of pesticides in the three matrices tested.

Precision (repeatability) and accuracy (expressed as recovery) for all food matrices were evaluated by spiking blank samples with a pesticide mixture in acetone at two levels: 0.05 and 0.5 mg/kg. The results are reported in Table 2. The method was found to have satisfactory precision (RSD < 20%) and accuracy at the 0.5-mg/kg level with acceptable recoveries (70–120%) for the vast majority of analyte/matrix combinations. Exceptions were picloram and quinclorac, which presented recoveries around 50–60% in several matrices tested. Only in a few cases were recoveries above 120% obtained (propiconazole, chlorpyrifos, pendimethalin), and all corresponded to papaya. This fact was surely due to a poorer correction of matrix effects as the fruit matrix chosen for the calibration standards was, in this case, maracuya.

At the low fortification level (0.05 mg/kg), the results were satisfactory for most analyte/matrix combinations when each fruit sample was analyzed using its own calibration

in matrix (gulupa, maracuya, uchuva). Less satisfactory data were obtained for the rest of the fruits (pithaya, tamarillo, papaya, and granadilla), showing that at the low residue level, the correction of matrix effects was a little bit more problematic. Surely, those cases (e.g., imidacloprid) where recoveries were out of 70–120% would have been corrected when using matrix-matched calibration in its own food matrix analyzed. Despite this fact, only a few pesticides showed recoveries out of the acceptable range established. Most of these corresponded again to the late-eluting pesticides, like butachlor, chlorpyrifos, and pendimethalin, indicating that at the end of the gradient, the amount of matrix components eluted made correction of matrix effects more complicated when a different fruit was used for matrix calibration. Picloram and fluazinam could not be validated at this level due to the lower sensitivity achieved for these two herbicides. The less satisfactory results were obtained for tamarillo, suggesting that matrix calibration should surely be performed with its own sample matrix, instead of with gulupa.

In our opinion, the use of only three matrices for calibration in the analysis of the seven matrices tested is a rather satisfactory compromise between appropriate matrix effects correction, cost, and time of the analysis. Certainly, using its own matrix for calibration is the best way to proceed, but this is not always feasible/realistic for routine laboratories that have to analyze many samples of quite different origins in everyday analysis.

The LOQ objective was established to be 0.05 mg/kg for the vast majority of analyte/matrix combinations as this was the lowest concentration in samples that was fully validated with satisfactory precision and accuracy [22]. The LOD was estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the lowest point of the matrix-matched standards calibration. The LODs for the three matrices (maracuya, uchuva, and gulupa) tested varied between 0.001 and 0.02 mg/kg. Exceptions were picloram and fluazinam with LODs around 0.06 mg/kg.

Illustrative chromatograms for blank and spiked papaya samples at the LOQ level (0.05 mg/kg) as well as maracuya matrix-matched standard are shown in Fig. 4 (quantification in papaya was made by matrix-matched calibration in maracuya). Early, medium, and late-eluting pesticides have been chosen to cover the range of chromatographic situations.

Analysis of samples

In order to test the method's applicability, several samples collected from the local market and/or supermarkets at Castellon were analyzed. This means that the samples were imported from Colombia and might be subjected to a stricter control of pesticide residues than other fruit samples used for internal (domestic) consumption. Therefore, the presence of pesticides in the samples analyzed was expected to be not much frequent.

Twenty samples were analyzed covering the seven tropical fruits under study. Positive findings of pyrimethanil (gulupa), imidacloprid and monocrotophos (maracuya), carbendazim (tamarillo and granadilla), and malathion (pithaya) were found. Only carbendazim was quantified (at around the LOQ level) in the tamarillo sample. The concentrations for the rest of the compounds were lower than 0.05 mg/kg. In spite of this, the satisfactory sensitivity reached for the compounds detected allowed their reliable confirmation, even at very low concentration levels, below the LOQ objective of the method (Fig. 5).

It is interesting to mention that an interfering compound was observed for malathion in several tropical fruit samples tested. This interference affected the transition that would have been normally selected for confirmation ($331 > 99$, Fig. 6). Consequently, it did not affect the quantification, but it would greatly affect the confirmation of the identity as the Q/q ratio was by far out of the acceptable limits. This interfering compound shared the same nominal transition used for malathion confirmation (i.e., $331 > 99$) and eluted at a similar retention time. The chromatographic separation between matrix co-eluting interferences and the analyte plays an important role for the appropriate quantification and/or confirmation of analytes. In this particular case, a third SRM transition (q_2) could be used for a safe confirmation of the presence of malathion in the pithaya sample. Despite its abundance being lower, the product ion m/z 125 was selected for confirmation instead of m/z 99.

COMPOUND (mg/kg)	GULUPA			PITHAYA*			TAMARILLO*			MARACUYA			PAPAYA**			GRANADILLA**			UCHUVA		
	0.05	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5
Metamidophos	89 (6)	91 (4)	124 (4)	118 (11)	99 (9)	116 (4)	77 (8)	79 (6)	107 (6)	75 (21)	107 (2)	96 (4)	78 (19)	93 (3)	80 (11)	92 (1)	95 (4)	97 (1)	98 (3)	93 (3)	93 (3)
Picloram	-	74 (15)	-	66 (10)	96 (25)	79 (6)	83 (3)	93 (2)	80 (5)	82 (3)	78 (7)	77 (1)	90 (7)	92 (1)	95 (4)	97 (1)	98 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)
Methomyl	86 (5)	74 (4)	96 (6)	83 (7)	98 (17)	93 (5)	83 (2)	90 (2)	103 (3)	99 (1)	88 (12)	85 (3)	95 (4)	97 (1)	98 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)
Thiametoxan	94 (4)	84 (4)	107 (4)	84 (10)	132 (16)	93 (5)	79 (3)	94 (2)	124 (3)	96 (8)	46 (20)	78 (3)	90 (9)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)	93 (3)
Monocrotophos	89 (3)	108 (3)	91 (9)	91 (9)	142 (3)	87 (8)	80 (4)	82 (5)	108 (3)	95 (3)	75 (2)	81 (3)	72 (7)	92 (1)	92 (1)	92 (1)	92 (1)	92 (1)	92 (1)	92 (1)	92 (1)
Imidacloprid	86 (7)	78 (4)	150 (4)	90 (11)	37 (6)	43 (7)	80 (4)	82 (5)	108 (3)	98 (2)	76 (5)	94 (2)	85 (6)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)
Quinclorac	92 (5)	70 (4)	73 (7)	37 (6)	101 (11)	107 (18)	78 (3)	88 (2)	102 (5)	96 (2)	88 (2)	78 (2)	89 (5)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)
Dimethoate	89 (3)	85 (5)	127 (5)	101 (11)	62 (41)	120 (6)	74 (2)	100 (3)	98 (2)	112 (3)	76 (5)	94 (2)	85 (6)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)	106 (2)
Carbendazim	70 (8)	108 (3)	89 (5)	102 (12)	105 (10)	109 (17)	78 (3)	88 (2)	102 (5)	96 (2)	88 (2)	78 (2)	89 (5)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)
Carbofuran	88 (4)	90 (5)	121 (3)	105 (11)	109 (17)	105 (10)	78 (3)	88 (2)	102 (5)	96 (2)	88 (2)	78 (2)	89 (5)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)	95 (1)
2,4 D	99 (19)	70 (4)	67 (19)	87 (15)	128 (19)	105 (10)	87 (7)	65 (12)	92 (12)	92 (4)	74 (19)	94 (10)	57 (14)	90 (5)	90 (5)	90 (5)	90 (5)	90 (5)	90 (5)	90 (5)	90 (5)
Atrazine	88 (3)	81 (4)	102 (5)	94 (8)	68 (15)	87 (8)	79 (3)	89 (2)	96 (4)	98 (3)	72 (2)	77 (2)	85 (4)	96 (4)	96 (4)	96 (4)	96 (4)	96 (4)	96 (4)	96 (4)	96 (4)
Diuron	93 (2)	75 (5)	99 (5)	91 (11)	75 (17)	83 (8)	83 (5)	103 (1)	103 (4)	109 (2)	78 (3)	84 (2)	84 (8)	94 (3)	94 (3)	94 (3)	94 (3)	94 (3)	94 (3)	94 (3)	94 (3)
Azoxystrobin	93 (2)	84 (5)	103 (6)	94 (13)	80 (15)	95 (11)	82 (3)	96 (0)	95 (4)	102 (3)	100 (5)	77 (3)	89 (9)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)
Clomazone	94 (2)	80 (4)	110 (5)	95 (12)	70 (13)	81 (8)	87 (2)	101 (2)	103 (5)	110 (2)	95 (5)	88 (2)	95 (2)	104 (2)	104 (2)	104 (2)	104 (2)	104 (2)	104 (2)	104 (2)	104 (2)
Ametryn	88 (0)	76 (4)	101 (12)	79 (9)	52 (14)	70 (5)	78 (3)	85 (1)	91 (5)	89 (3)	65 (4)	74 (1)	75 (5)	89 (2)	89 (2)	89 (2)	89 (2)	89 (2)	89 (2)	89 (2)	89 (2)
Parathion-methyl	89 (9)	73 (4)	93 (12)	88 (12)	72 (21)	92 (8)	88 (8)	95 (4)	93 (7)	92 (2)	95 (7)	86 (11)	93 (5)	94 (14)	94 (14)	94 (14)	94 (14)	94 (14)	94 (14)	94 (14)	94 (14)
Pyrimethanil	101 (3)	87 (4)	35 (9)	82 (12)	-	52 (13)	78 (3)	100 (2)	88 (5)	99 (4)	86 (3)	79 (1)	99 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)
Fludioxonil	87 (16)	79 (4)	104 (18)	105 (15)	70 (26)	89 (5)	80 (14)	107 (3)	97 (13)	113 (8)	90 (15)	95 (2)	88 (19)	107 (2)	107 (2)	107 (2)	107 (2)	107 (2)	107 (2)	107 (2)	107 (2)
Malathion	93 (2)	81 (3)	107 (5)	94 (13)	i	93 (7)	85 (2)	97 (3)	97 (3)	112 (4)	88 (4)	97 (2)	78 (7)	99 (2)	99 (2)	99 (2)	99 (2)	99 (2)	99 (2)	99 (2)	99 (2)
Propanil	95 (4)	82 (5)	111 (4)	104 (12)	81 (17)	87 (8)	88 (0)	103 (1)	111 (6)	116 (2)	97 (5)	94 (2)	92 (8)	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)
Terbutryn	93 (2)	81 (5)	87 (8)	77 (12)	73 (16)	68 (4)	81 (2)	92 (2)	85 (5)	93 (2)	82 (3)	75 (2)	93 (8)	92 (3)	92 (3)	92 (3)	92 (3)	92 (3)	92 (3)	92 (3)	92 (3)
Propiconazole	96 (4)	70 (3)	114 (6)	79 (12)	75 (7)	85 (9)	86 (6)	82 (2)	103 (7)	142 (3)	85 (6)	76 (4)	84 (2)	84 (2)	84 (2)	84 (2)	84 (2)	84 (2)	84 (2)	84 (2)	84 (2)
Cyprodinil	97 (7)	80 (10)	81 (10)	70 (12)	78 (6)	80 (5)	79 (3)	84 (1)	86 (5)	83 (4)	72 (13)	64 (6)	89 (6)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)	83 (4)
Prinimphos-methyl	104 (2)	72 (4)	99 (8)	70 (10)	68 (18)	71 (9)	94 (2)	94 (2)	98 (2)	83 (4)	75 (4)	114 (20)	88 (2)	88 (2)	88 (2)	88 (2)	88 (2)	88 (2)	88 (2)	88 (2)	88 (2)
Fluazianil	-	94 (14)	-	80 (12)	-	83 (8)	-	70 (10)	-	109 (1)	-	114 (20)	-	85 (5)	85 (5)	85 (5)	85 (5)	85 (5)	85 (5)	85 (5)	85 (5)
Butachlor	119 (11)	71 (8)	116 (13)	76 (10)	108 (23)	80 (12)	93 (4)	101 (6)	118 (6)	110 (23)	82 (6)	92 (4)	89 (15)	91 (8)	91 (8)	91 (8)	91 (8)	91 (8)	91 (8)	91 (8)	91 (8)
Chlorpyrifos	115 (7)	88 (16)	121 (6)	77 (11)	106 (21)	79 (5)	99 (5)	92 (4)	171 (8)	123 (2)	145 (36)	115 (11)	91 (7)	94 (5)	94 (5)	94 (5)	94 (5)	94 (5)	94 (5)	94 (5)	94 (5)
Pendimethalin	124 (9)	88 (12)	125 (6)	82 (9)	145 (15)	79 (5)	105 (5)	94 (8)	166 (5)	131 (22)	177 (37)	116 (10)	99 (8)	91 (5)	91 (5)	91 (5)	91 (5)	91 (5)	91 (5)	91 (5)	91 (5)

Table 2. Method validation in tropical fruit samples.

Recovery (%) and relative standard deviation (RSD (%), in parentheses) for five replicates at 0.05 and 0.5 mg/kg

^a Calibration in matrix made with gulupa^b Calibration in matrix made with maracuya^c An interference was present in this sample and prevented an appropriate quantification at the low spiking level

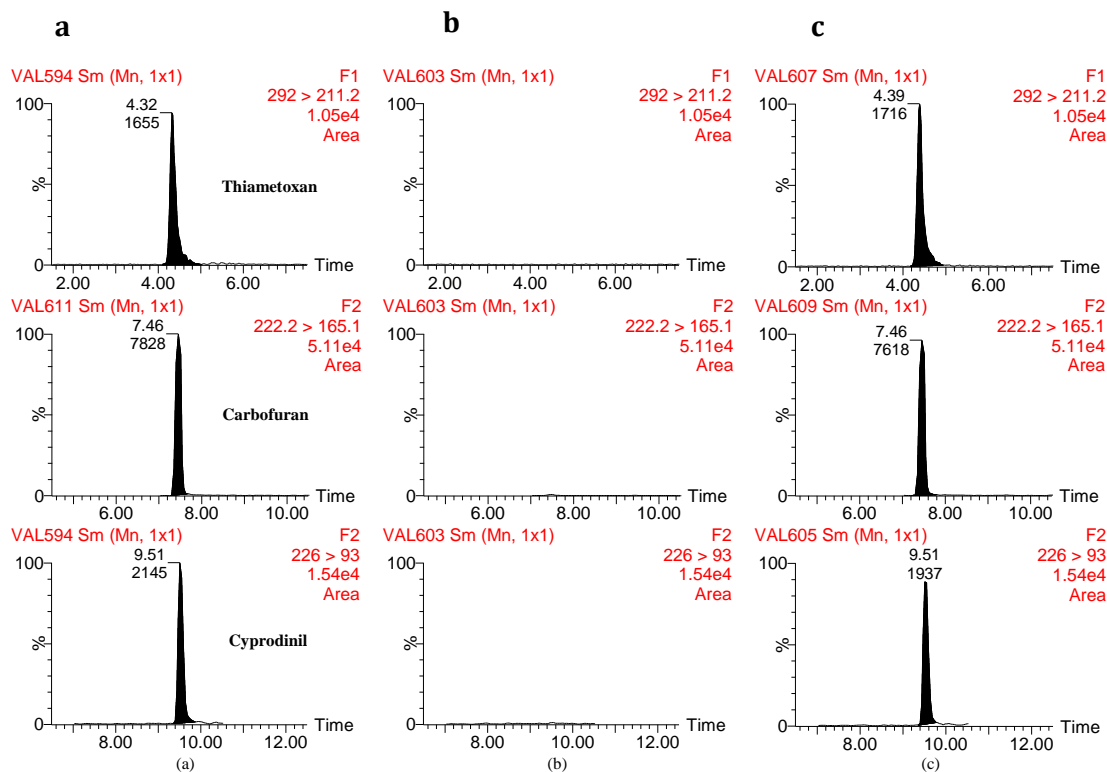


Fig. 4 LC-MS/MS chromatograms for the selected compounds obtained in recovery experiments: standard in maracuya matrix at 2.5 ng/mL (a); papaya blank sample (b); papaya spiked at 0.05 mg/kg (c).

The determination of malathion was particularly problematic. Thus, another interference was observed in tamarillo samples during validation at the LOQ level. In this case, a matrix component seemed to share the same nominal quantification transition (331 > 127) as malathion, eluting at a similar retention time (see Table 2). At this point, the tamarillo extracts were also injected in UHPLC- QTOF-MS under MS^E mode. With MS^E experiments, both the (de)protonated molecule and fragment ion data are enabled in a single acquisition without the need of selecting a precursor ion.

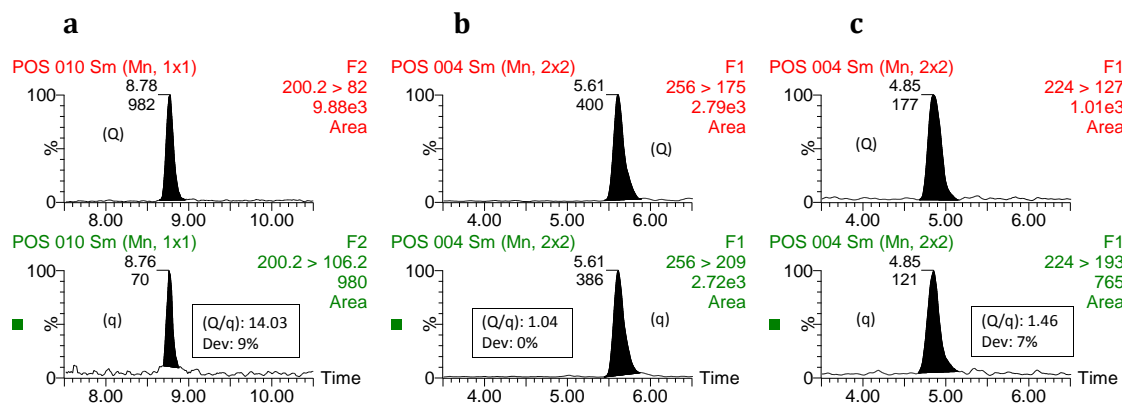


Fig. 5 LC-MS/MS chromatograms for positive findings in some tropical fruits: pyrimethanil in gulupa (estimated concentration 0.02 mg/kg) (a);imidacloprid in maracuya (estimated concentration 0.025 mg/kg) (b);monocrotophos in maracuya (estimated concentration <0.02 mg/kg) (c). Q quantification transition, q confirmation transition.

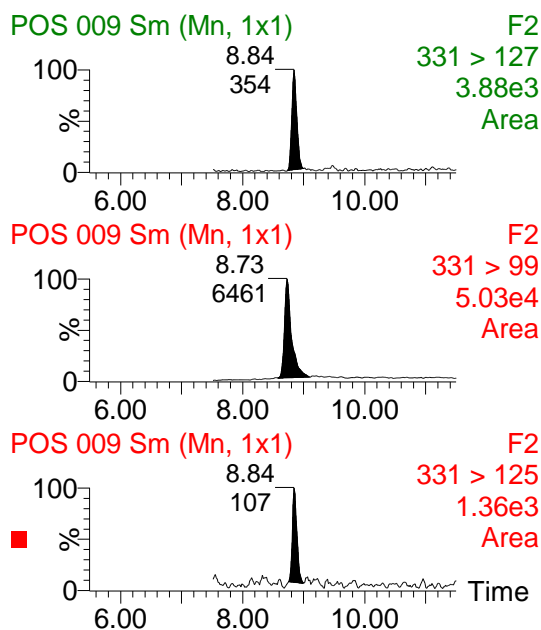


Fig. 6 LC-MS/MS chromatograms for a positive finding of malathion in pithaya. Q quantification transition, q1, q2 confirmation transitions. q2 transition was shared by an unknown matrix co-eluting component research would be required to elucidate the unknown matrix compound, which was out of the objectives of this paper.

The MS^E experiments involve the simultaneous acquisition of exact mass data at low and high collision energies. By applying LE in the collision cell, fragmentation is minimized and the information obtained corresponds normally to non-fragmented ions, related to the parent molecule. However, at HE, fragmentation is promoted, resulting in abundant fragments. In some cases, the (de)protonated molecule can also be observed in the HE TOF-MS spectra [21]. Figure 7 shows the LE and HE spectra of both malathion and the interference in the tamarillo spiked at the 0.05-mg/kg level as well as the exact mass UHPLC chromatograms for parent(s) and main fragments. As can be seen in the LE spectrum (Fig. 7b, top), the accurate mass of the protonated molecule of malathion was m/z 331.0439 (with 0-mDa mass error with respect to its exact mass), whereas the interference was m/z 331.1023. This would suppose a mass error of 58.4 mDa with respect to the exact mass of malathion. The LE spectrum of this pesticide also showed an intense peak corresponding to the sodium adduct (m/z 353.0257, 0.1 mDa), which was more abundant than the protonated molecule, absent in the case of the interferent.

Regarding the HE spectra (**Fig. 7b, bottom**), malathion presented three important fragments at m/z 99.0079 (mass error of -0.3 mDa), 124.9824 (-0.2 mDa) and 127.0390 (-0.5 mDa). The HE spectrum of the matrix component also presented a fragment ion at m/z 127.0389. This indicates that an isobaric interference was actually present in the sample, sharing the quantitative transition used for malathion (331>127). Indeed, as can be seen in the exact mass chromatogram for the m/z 127 fragment (**Fig 7a, bottom**), its selectivity was lower than using fragments at m/z 99 or 125, even selecting a narrow mass extraction window of 10 mDa, indicating that many other matrix components also produced the m/z 127 ion. Moreover, the increased chromatographic resolution achieved by UHPLC clearly allowed to separate malathion from the interference, and even to realize that the interference was splitted into two chromatographic peaks actually (**Fig 7a, top**). More research would be required to elucidate the unknown matrix compound, which was out of the objectives of this paper.

It seems that confirmation of positives by compliance of Q/q ratio is a controversial subject, as previously reported by our own research group [24,25]. False negatives might occur when an interferent compound shares one of the MS/MS transitions, therefore leading to the non-compliance of Q/q ratio. Under these circumstances, improving the chromatographic

separation (e.g. UHPLC) and/or using high resolution MS can help to discriminating potential interferences from the analytes.

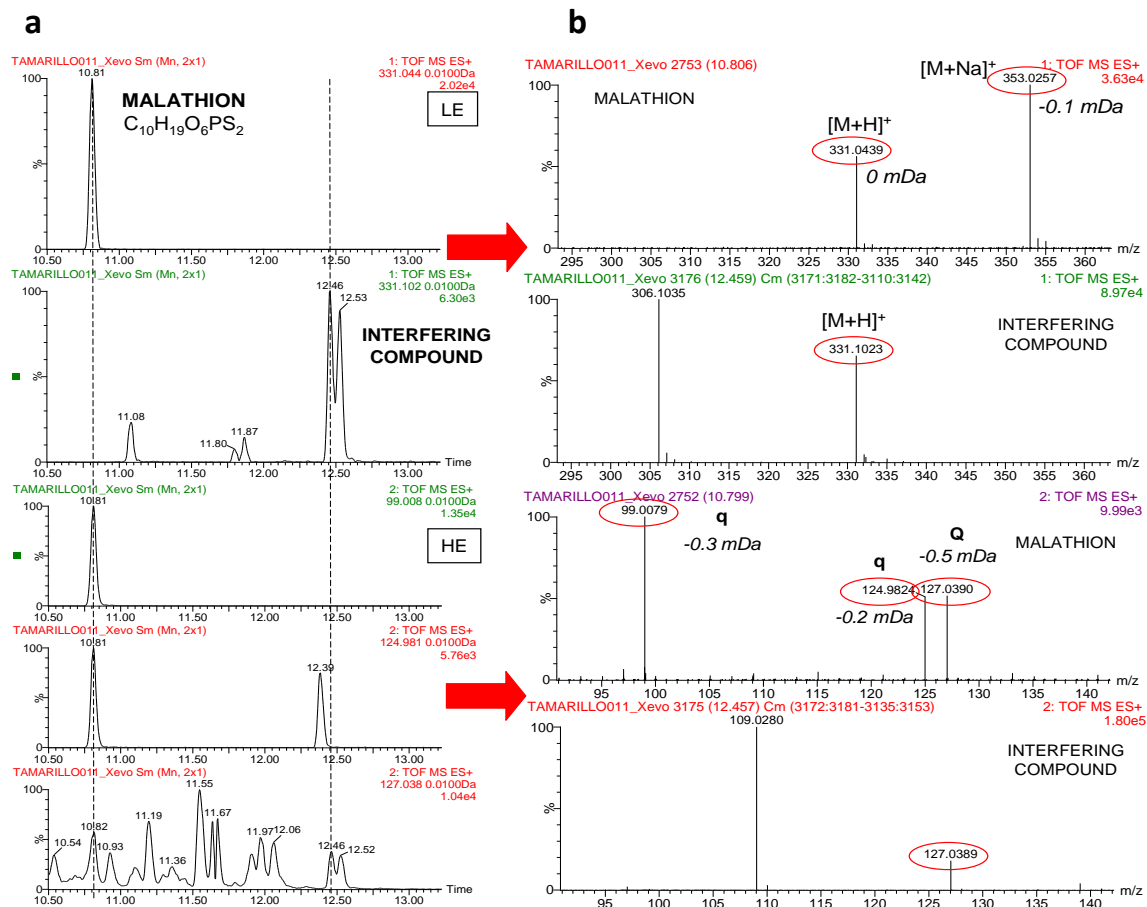


Fig. 7 Chromatograms and mass spectra illustrating the presence of malathion and an interfering compound in a tamarillo sample spiked at 0.05 mg/kg using UHPLC-QTOF (MS^E approach). a). Exact mass UHPLC chromatograms at low (LE) and high (HE) collision energy for the tamarillo spiked sample. b). LE and HE spectra for malathion and the interfering compound.

CONCLUSIONS

Nowadays, many multiresidue methods already exist for pesticides in fruits and vegetables. However, there is a general lack of analytical methodology for tropical products, which becomes a problem when assessing the compliance of Maximum Residue Levels in these products. In this work, a rapid LC-MS/MS multiresidue method has been developed for the simultaneous determination of around 30 pesticides in seven tropical fruits, which mostly have been scarcely studied until now. After extraction with acetonitrile, the sample extract was injected into the LC-MS/MS without any clean-up step. Matrix interferences were corrected by using matrix-matched standards calibration. After a careful study of matrix effects in the fruit matrices, three of them (uchuva, maracuya, gulupa) were selected to perform calibration in the analysis of all the seven fruit selected. Thus, calibration with maracuya was used in the analysis analysis of papaya, granadilla and maracuya; calibration with gulupa was used for pithaya, tamarillo and gulupa;and uchuva was analyzed with its own matrix calibration.

After validation of the method at two concentration levels (0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg), it was applied to tropical fruit samples exported from Colombia, and collected from some Spanish markets. Several pesticides, like pyrimethanyl in gulupa, malathion in pithaya, monocrotophos and imidacloprid in maracuyá, carbendazim in granadilla and tamarillo, were detected in the samples, all at concentration levels around or lower than 0.05 mg/kg. Up to two interfering compounds were observed for malathion in several of the samples analyzed, sharing the quantification or the confirmation transition selected for this pesticide, and eluting at very close retention time. The acquisition of three transitions for malathion in pithaya analysis allowed to discard the transition that was interfered. Then, this compound could be confirmed to be present in the sample by the accomplishment of the Q/q ratio of the remaining transitions as well as retention time. This fact reveals the usefulness of acquiring more than two transitions, if feasible, in LC-MS/MS methods to prevent problems associated to the confirmation of potential positives in those cases where the Q/q ratios are not in agreement with the reference standards.

Accurate mass measurements provided by LC-QTOF MS revealed that malathion and a matrix interferent shared the same nominal-mass transitions, but had different accurate mass. Therefore, their discrimination was feasible by accurate mass measurements. The use of

UHPLC also allowed discrimination of analyte and interference by retention times thanks to the improved chromatographic resolution, illustrating in this way the importance of an appropriate chromatographic separation even using a powerful analytical technique for measurement like MS/MS.

Future research will be focused on lowering the LOQs objective for a few analyte-matrix combinations that have default MRL values lower than 0.05 mg/kg. Maintaining the philosophy of this work on simply “extract, dilute and inject”, this objective will be highly facilitated with the use of new-generation LC-MS/MS instruments. Also, the metabolites included in the residue definition for some of the compounds under study (e.g. carbofuran, dimethoate, malathion, carbendazim,) will be studied in the near future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Proexport for the useful information provided on tropical fruits exportation from Colombia, and to Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) for providing information on pesticides usage in Colombia. The financial support of Generalitat Valenciana, as research group of excellence (Prometeo 2009/054) is also acknowledged.

REFERENCES

- [1] <http://www.proexport.com.co>. Accessed March 2011
- [2] Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B (2006) *Mass Spectrom Rev* 25: 838-865
- [3] Hernández F, Pozo OJ, Sancho JV, Bijlsma L, Barreda M, Pitarch E (2006) *J Chromatogr A* 1109: 242-252
- [4] Picó Y, Font G, Ruiz MJ, Fernández M (2006) *Mass Spectrom Rev* 25: 917-960
- [5] Kmellár B, Fodor P, Pareja L, Ferrer C, Martínez-Uroz MA, Valverde A, Fernandez-Alba AR (2008) *J Chromatogr A* 1215: 37-50
- [6] Kmellár B, Abrankó L, Fodora P, Lehotay SJ (2010) *Food Addit Contam* 27: 1415-1430
- [7] Camino-Sánchez FJ, Zafra-Gómez A, Oliver-Rodríguez B, Ballesteros O, Navalón A, Crovetto G, Vílchez JL (2010) *Food Addit Contam* 27: 1532-1544
- [8] Grimalt S, Sancho JV, Pozo OJ, Hernández F (2010) *J Mass Spectrom* 45: 421-436
- [9] Lehotay SJ, de Kok A, Hiemstra M, van Bodegraven P (2005) *J AOAC Int* 90: 595-614
- [10] Pihlström T, Blomkvist G, Friman P, Pagard U, Österdahl BG (2007) *Anal Bioanal Chem* 389: 1773-1789
- [11] Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N (2010) *J Chromatogr A* 1217: 2548-2560
- [12] Gebara AB, Ciscato CHP, Ferreira MS, Monteiro SH (2005) *Bull Environ Contam Toxicol* 75: 163-169
- [13] Ciscato CHP, Guebara AB, Monteiro SH (2009) *Food Addit Contam* 2:140-145
- [14] Specht W, Manual of Pesticide Residue Analysis, DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft, Pesticides Commission. Weinheim: VCH. p.317-322 (1992)
- [15] Banerjee K, Oulkar DP, Patil SB, Jadhav MR, Dasgupta S, Patil SH, Bal S, Adsule PG (2009) *J Agric Food Chem* 57: 4068-4078

- [16] Savant RH, Banerjee K, Utture SC, Patil SH, Dasgupta S, Ghaste MS, Adsule PG (2010) J Agric Food Chem 58: 1447-1454
- [17] Navickiene S, Aquino A, Bezerra DSS (2010) J Chromatogr Sci 48: 1-5
- [18] Sundravadana S, Alice D, Samiyappan R, Kuttalam S (2008) J Braz Chem Soc 19: 60-63
- [19] Hjoorth K, Johansen K, Holen B, Andersson A, Christensen HB, Siivinen K, Toome M (2011) Food Control 22: 1701-1706
- [20] FAO document BA/TF03/15. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental group of bananas and tropical fruits, Dec 2003 (<http://www.fao.org/corp>).
- [21] Hernández F, Bijlsma L, Sancho JV, Díaz R, Ibáñez M (2011) Anal Chim Acta 684: 87-97
- [22] Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed Document No. SANCO/10684/2009
- [23] European Union Decision 2002/657/EC, Off J Eur Comm L221, (12 August 2002) 8
- [24] Pozo OJ, Sancho JV, Ibáñez M, Hernández F, Niessen WMA (2006) Trends Anal Chem 25: 1030-1042
- [25] Portoles T, Pitarch E, López FJ, Hernández F (2011) J. Chromatogr. A 1218: 303-315

2.1.3 Artículo Científico 2

Exploring matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits

A.M. Botero-Coy, J. M. Marín, R. Serrano, J. V. Sancho, F. Hernández*

Anal Bioanalytical Chemistry (2015), 407:3667–3681

Anal Bioanal Chem (2015) 407:3667–3681
DOI 10.1007/s00216-015-8586-5

RESEARCH PAPER

Exploring matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits

Ana María Botero-Coy · José M. Marín · Roque Serrano ·
Juan Vicente Sancho · Félix HernándezReceived: 27 November 2014 / Revised: 10 February 2015 / Accepted: 20 February 2015 / Published online: 14 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Tropical fruits are being increasingly consumed around the world because of their appreciated characteristics, particularly their high nutritional value and distinctive taste, which are different from those of traditional fruits. Owing to their introduction into international markets it is necessary to have a reliable analytical methodology available for the sensitive determination of pesticide residues in order to monitor the compliance of maximum residue limits (MRLs). From an analytical point of view, tropical fruits have generally been far less studied than other fruits frequently consumed in the European Union or USA, which are among the most important markets. In this work, LC–MS/MS-based methodology using a triple quadrupole analyzer was developed for the multi-residue determination of selected pesticides and metabolites in tropical fruits, which were selected among the most popular in Colombia, one of the most important suppliers of tropical fruits around the world. After selection of a QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*)-based sample treatment, the study focused on the evaluation of matrix effects, in order to find a simple way for their correction. Twelve different food matrices were selected to perform this study: the seven Colombian tropical fruits of highest value for domestic and international markets (uchuva, tamarillo, granadilla, gulupa, maracuya, papaya, and pithaya), and five more matrices highly consumed in Colombia (lulo, carambolo, feijoa, mangostan, and guayaba). Twenty compounds, including pesticides widely applied in tropical fruits pest control and several metabolites considered in residue definition, were used as

model compounds in this work. Correction factors were used on the basis of calibration graphs obtained with standards in solvent and in matrix, and their usefulness was supported by validation of the method in all the matrices tested at 0.01 and 0.1 mg/kg. The analysis of real-world samples revealed the presence of several target compounds that were identified by the acquisition of two MS/MS transitions, and by ion intensity ratio and retention time agreement.

Keywords Pesticide residue analysis · Tropical fruits · Matrix effects · LC–tandem MS · Colombia fruit matrices

Introduction

Tropical fruits are of great importance for the economy of several continents around the world, particularly in South America, Asia, and Africa, where agricultural activities are mainly based on these types of crops. They are grown under special climatic conditions that give them particular nutritional and organoleptic characteristics. The demand for tropical fruits has increased in recent years because of their particular characteristics of taste, flavor, vitamin content (e.g., vitamin C), and carotene and antioxidant components [1]. Consequently, there is interest in developing and/or adapting analytical methodologies for the determination of pesticide residues in tropical fruits, in order to monitor the compliance of maximum residue limits (MRLs). Moreover, in many of these products, MRLs are set by default at a specific low value (i.e., the limit of determination of an analytical method developed for each pesticide in another (similar) food matrix) [2]. This is due to the lack of studies on residue trials performed in compliance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP) directed towards registration of the product and the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-015-8586-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. M. Botero-Coy · J. M. Marín · R. Serrano · J. V. Sancho ·
F. Hernández (✉)
Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I,
12071 Castellón, Spain
e-mail: felix.hernandez@uji.es

Exploring matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits

Anal Bioanalytical Chemistry (2015) 407:3667–3681.

Ana María Botero-Coy, José M. Marín, Roque Serrano, Juan Vicente Sancho, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071, Castellon, Spain

ABSTRACT

Tropical fruits are being increasingly consumed around the world because of their appreciated characteristics, particularly their high nutritional value and distinctive taste, different to traditional fruits. Due to their introduction in international markets it is necessary to have a reliable analytical methodology available for the sensitive determination of pesticide residues in order to monitor the compliance of maximum residue limits (MRLs) from an analytical point of view, tropical fruits have generally been far less studied than other fruits frequently consumed in the European Union or USA, which are among the most important markets. In this work, LC-MS/MS-based methodology using triple quadrupole analyzer has been developed for the multi-residue determination of selected pesticides and metabolites in tropical fruits, which were selected among the most popular in Colombia, one of the most important suppliers of tropical fruits around the world. After selection of a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)-based sample treatment, the study was focused on matrix effects evaluation, in order to find a simple way for their correction. Twelve different food matrices were selected to perform this study: the seven Colombian tropical fruits of highest value for domestic and international markets (uchuva, tamarillo, granadilla, gulupa, maracuya, papaya and pithaya), and five more matrices highly consumed in Colombia (lulo, carambolo, feijoa, mangostan and guayaba). Twenty compounds, including pesticides widely applied in tropical fruits pest control and several metabolites considered in residue definition, were used as model compounds in this work. Correction factors were used on the basis of calibration graphs obtained with standards in solvent and in matrix, and their usefulness was supported by validation of the method in all the matrices tested at 0.01 mg/kg and 0.1 mg/kg. The analysis of real-world samples revealed the

presence of several target compounds that were identified by the acquisition of two MS/MS transitions, and by ion intensity ratio and retention time agreement.

KEYWORDS Pesticide residue analysis; tropical fruits; matrix effects, LC-tandem MS, Colombia fruit matrices.

INTRODUCTION

Tropical fruits are of great importance for the economy of several countries around the world, particularly in South America, Asia or Africa, where agricultural activities are mainly based on these types of crops. They are grown under special climatic conditions that give them particular nutritional and organoleptic characteristics. The demand for tropical fruits has increased in the last years because of their particular characteristics of taste, flavor and vitamin content (e.g Vitamin C), carotenes and antioxidant components (FAO, 2003). Consequently, there is interest in developing and/or adapting analytical methodologies for the determination of pesticide residues in tropical fruits, in order to monitor the compliance of Maximum Residue Limits (MRL). Moreover, in many of these products, MRLs are set by default at a specific low value (i.e. the limit of determination of an analytical method developed for each pesticide in another (similar) food matrix) (European Union Decision, 2005). This is due to the lack of studies on residue trials performed in compliance with the principles of Good Laboratory Practices (GLP) directed towards registration of the product and the establishing of MRL. It seems clear that analytical methodologies are currently required for tropical fruits, in order to monitor the compliance of MRLs, but also to facilitate the performance of the analytical part of GLP studies to set-up new MRLs on the basis of new residue trials.

Colombia is one of the main suppliers of exotic fruits in the world. Among the main fruits exported are uchuva, tamarillo, tamarindo, granadilla, pithaya, gulupa and baby banana. The main destinations of these products are The Netherlands, Germany, France, Belgium and Spain. It is worth noting that Colombia is the world's first producer of uchuva. In 2012, the total export value of Colombian uchuva was USD 29.2 million, and it was the most important fruit in International trademark, followed by gulupa (USD 12 million), granadilla (USD 2.9 million), pithaya (USD 2 million), "tomate de árbol" or tamarillo (USD 1.3 million) and, to a

lesser extent, maracuya and feijoa, giving a total of USD 48,6 million. During the first term of 2014, an increase of 14.5% was observed in tropical fruits exportation in relation to 2013 (Legiscomex, 2013).

The use of Multi-Residue Methods (MRMs) is currently required in the field of Pesticide Residue Analysis (PRA) as the only realistic way to monitor a large number of pesticides in the great number of samples that are commonly analyzed in specialized laboratories. Most MRMs reported for fruits and vegetables in the last decade are based on the use of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), which is considered the technique of choice for the majority of pesticides and metabolites. Its excellent sensitivity, selectivity and robustness, and its suitability for most pesticides currently used, of medium-high polarity and medium-low volatility, are among the main reasons for its wide use (Botitsi et al., 2011). However, little attention has been paid to tropical fruits, and there is a general lack of analytical methodology available for these types of food matrices. Some of the methods reported are based on gas chromatography with conventional detectors, and on LC-UV/VIS or fluorescence detectors (Gebara et al., 2005), which required the confirmation of positive findings by MS. Papaya, mango and guava are among the most studied tropical matrices [15,(Ciscato et al., 2009) (Banerjee et al., 2009)].

The results on pesticide residues in a wide monitoring of fruit and vegetable samples from South America revealed the post-harvest fungicides thiabendazole and imazalil, and the insecticide chlorpyrifos as the pesticides most frequently detected (Hjorth et al., 2011). Pesticides detected in tropical fruits, like papaya, mango and passion fruit, were chlorothalonil, dimethoate, thiacloprid, imidacloprid, methomyl, cypermethrin, lambda-cyhalothrin, propamocarb, and dithiocarbamates. Recently, a GC-MS multi-residue method based on the use of QuEChERS CEN (European Committee for Standardization) procedure has been developed for 50 pesticides in tropical fruits, and validated for tomato, tamarillo and goldenberries (uchuva). The method was applied to the analysis of samples collected from Antioquia (Colombia), and allowed an initial risk assessment, especially for tomatoes, where several pesticides such carbaryl, carbofuran, diazinon, dimethoate, endosulfan alpha, endosulfan beta and p,p'-DDT were detected (Ramírez Restrepo et al., 2014).

Taylor [24] considered matrix effects as the “Achilles heel” of LC-MS-based methods. Previous to his paper and especially in the last decade, many articles have been reported

dealing with matrix effects in LC–MS/MS methods for pesticide residues in environmental, biological, and food matrices [6, 13, 25–35]. Different alternatives are normally applied to remove, minimize, and/or correct this undesirable effect [26, 27]. The most popular are the use of matrix-matched standards calibration, the application of clean-up steps during the sample treatment, and the use of appropriate internal standards (commonly, isotope-labeled internal standards, ILIS) [6, 26, 35, 36]. In theory, one of the most accurate approaches is standard additions, but unfortunately it increases the number of injections and requires one to roughly know the analyte concentration in the sample to adjust the additions to the correct level. Moreover, ILIS are expensive and not always commercially available. Their use is rather frequent in single methods for specific pesticides, but not in MRMs where a high number of ILIS would be required. Other possibilities, such as optimization of chromatographic separation and/or MS measurements [26, 37], are less applicable in MRMs involving large numbers of compounds. Another report details the selection of a few representative matrices to prepare matrix-matched standards for all type of samples analyzed, assuming that matrix effects are comparable between similar matrices [38]. Thus, Kmellár et al. classified the samples analyzed into three groups for preparation of calibration curves: tomato, representing commodities of high water content; pear representing commodities of high sugar content; and orange representing those of high acidic content [9]. Dilution of sample extracts can be also used to minimize matrix effects and to make different sample extracts more similar if the method has sufficient sensitivity, a fact that is becoming more common with the instrumentation available nowadays [32].

Matrix effects can lead to both ionization suppression and enhancement. This fact clearly affects quantification of analytes if not properly corrected. But matrix effects may also affect the identification of the compound detected, as this process is normally based on the acquisition of two selected reaction monitoring (SRM) transitions (in tandem MS methods): one for quantification and the other for confirmation of the identity. Typically, the second transition is less intense than the first one as a result of the lower abundance of the product ion selected. Thus, strong ionization suppression may hamper the presence of the peak at the second transition, avoiding the confirmation of the compound at low concentrations. In addition, the presence of co-eluting matrix components interfering with the ions used for quantification and/or confirmation may also affect the ion intensity ratio, hindering its compliance within the tolerances allowed [39, 40]. As a consequence, matrix effects need to

be properly corrected; this becoming one of the most challenging tasks in LC–MS/MS-based MRMs.

Different sample treatments have been developed for pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Among them the QuEChERS procedure has become the most popular, as illustrated by the high number of references since the first publication [41]. The original procedure was based on extraction with acetonitrile, separation of water from acetonitrile by addition of anhydrous MgSO_4 and NaCl , and subsequent clean-up using dispersive solid-phase extraction (d-SPE) with a primary secondary amine (PSA), which efficiently removes many polar interfering substances present in the matrix. From the original unbuffered version published in 2003 [41], different versions/modifications have been reported to improve its applicability to more and more pesticides, especially for pH dependent pesticides, and more complex sample matrices [42–44]. The most popular accepted versions are the AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) Official Method 2007, which uses acetate buffer [45], and the CEN Standard Method EN 15662, which uses citrate buffering [46]. A combination of different sorbents can be used in d-SPE to improve the clean-up step. Thus, a mixture of three sorbents (C_{18} , PSA, and graphitized carbon black, GCB) has been shown to be efficient for most analytes tested [43]. Recently, a comparison of QuEChERS official methodologies was done for the multi-residue determination of 33 pesticides in Colombian fruits by GC–MS using large volume injection [47]. The CEN method was preferred because acceptable recoveries were achieved for all analytes. The use of GCB in the clean-up step did not improve the results and it was found not to be much use for clean-up purposes.

In this work, analytical methodology was developed for the LC–MS/MS residue determination of 20 compounds (including six metabolites) frequently applied for pest control in tropical fruits. Twelve tropical food matrices were selected among those of highest commercial value in Colombia. Their common and scientific names, taxonomic classification, and inclusion in the European Union (EU) group products for MRLs compliance [2] are included in Fig. 1. Nine out of 12 products are included in fresh fruits group (miscellaneous fruits), while the remaining three belong to the Solanaceae family and are included in vegetable fresh group (fruiting vegetables). Most of the MRLs applied to the pesticides and food products studied in this work are set at default values of 0.01, 0.02, or 0.05 mg/kg, which correspond to the limit of determination/quantification of the analytical method (marked as with an asterisk in Table S1 in the Electronic Supplementary Material, ESM). QuEChERS (CEN citrate version) was

selected for sample extraction and clean-up, and LC-MS/MS with a triple quadrupole was used for analysis. Special attention was paid to matrix effects, trying to find a simple and generic solution for appropriate correction. The applicability of the method was tested by analyzing samples collected from local markets in Colombia and samples exported to Spain.

EXPERIMENTAL

Reagents and chemicals

Pesticide reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade methanol, HPLC-grade acetonitrile (ACN) and acetone for residue analysis, Magnesium sulfate, Sodium Chloride, Sodium hydrogencitrate sesquihydrate and Sodium Citrate were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Formic acid (HCOOH, 98 - 100%) and ammonium acetate (NH₄Ac, reagent grade) were supplied by Scharlau.

Stock standard solutions were prepared dissolving 50 mg, accurately weighted, in 100 mL of acetone obtaining a final concentration of around 500 mg/L. For LC-MS analysis, the stock solutions were diluted with acetonitrile to prepare individual solutions of around 50 mg/L. From these, mixed solutions of 5 pesticides were prepared by diluting with acetonitrile to obtain a final concentration of 5 mg/L. Working mixed solutions of all pesticides were prepared from the 5 mg/L solutions by dilution with acetonitrile.

Mixed solutions of 1 mg/L and 0.1 mg/L in acetonitrile were used for sample fortification in recovery experiments.

In the clean-up step, two types of 2-mL microcentrifuge tubes for QuEChERS d-SPE were used, containing: 150 mg anhydrous MgSO₄, 25 mg PSA and 25 mg C18 (XE-29508); or 150 mg anhydrous MgSO₄ and 50 mg PSA (XE-29511) (Teknokroma, Barcelona, Spain).

Liquid chromatography/mass spectrometry

A Waters Alliance 2795 LC system was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters) using an orthogonal Z-spray electrospray interface. The LC separation was performed with an Atlantis dC18 column (5 μ m, 2.1 \times 100 mm; Waters) at 0.3 mL/min. The mobile phase used was a water/methanol (both 0.1 mM NH₄Ac and 0.01 % (2 mM) HCOOH) gradient in which the percentage of methanol changed as follows: 0 min, 5 %; 1 min, 5 %; 10 min, 90 %; 13 min, 90 %, 14.1 min, 5 %.

For operation in MS/MS mode, the collision gas was argon (99.995 %; Praxair, Valencia, Spain) at a pressure of 2×10^{-3} mbar in the collision cell. A capillary voltage of 3.5 kV in positive mode was used. The interface temperature was 350 °C and source temperature 120 °C. Dwell times of 0.1 s were selected. Two solvent delays were applied as an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by Masslynx v.4.1 software, the first one from 0 to 4.5 min, and the second from 15 to 17 min. The application manager TargetLynx was used to process the quantitative data. For more details see reference [38].

Samples

Samples used in this study were exported from Colombia to the EU, specifically to Spain. They were acquired in Spanish markets and hypermarkets from Barcelona and from Castellon. Then, they were transported to the laboratory and processed for analysis. All samples (commonly 6 individual pieces) were homogenized (pulp, small stones and peel). Stones were removed before triturating only in the case of mangostan, due to their larger size. In the case of uchuva, the calyx was also removed. This group of samples, acquired in Spain, was used for analysis and also as “blank” samples for validation of the method. Another group of samples were collected directly in Bogotá, where they were acquired in a local market. They were processed as indicated above and the triturated sample was stored in the freezer at <-18°C. Later, they were transported to Spain where they arrived within a maximum period of time of 24 h. This second group of samples was used for analysis and, also to prepare quality controls (QCs) of the analytical procedure.













Fruit	Scientific name	Family	MRL Group, Annex I
 Mangostan	<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae	1.Fruits fresh (vi): Miscellaneous fruit (b): Inedible peel, small -Lychee
 Pithaya (1)	<i>Hylocereus Selenicereus</i>	Cactaceae	
 Guayaba (1)	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	1.Fruits fresh (vi): Miscellaneous fruit (c): Inedible peel, large -(1) Guava -(2) Papaya
 Feijoa (1)	<i>Feijoa sellowiana</i>		
 Papaya (2)	<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	1.Fruits fresh (vi): Miscellaneous fruit (a): Edible peel -Carambolo
 Carambolo	<i>Averrhoa carambola</i>	Oxalidaceae	
 Maracuya	<i>Passiflora edulis</i>	Passifloraceae	1.Fruits fresh (vi): Miscellaneous fruit (b): Inedible peel, small - Passion Fruit
 Gulupa	<i>Passiflora pinnatisipula</i>		
 Granadilla	<i>Passiflora ligularis</i>		
 Tamarillo (3)	<i>Cyphomandra betacea</i>	Solanaceae	2. Vegetables fresh (iii): Fruiting vegetables (a): Solanacea -(3) Tomatoes -(4) Others
 Uchuva (3)	<i>Physalis peruviana</i> L.		
 Lulo (4)	<i>Solanum quitoense</i>		

Fig. 1 Tropical fruits studied in this work and MRLs groups as classified in Annex I "Products of plant and animal origin" [2]

Recommended procedure

Ten grams of homogenized sample were accurately weighed (precision 0.1 mg) in a 50-mL polypropylene centrifuge tube. Extraction was carried out using 10 mL acetonitrile, shaking by hand for 1 min. Then, 4 g magnesium sulfate, 1 g sodium chloride, 0.5 g sodium hydrogencitrate sesquihydrate and 1 g sodium citrate were added and immediately shaken vigorously by hand to prevent formation of MgSO₄ agglomerates. The tube was centrifuged at 4,600 rpm for 10 min.

For the clean-up step, 1 mL of the upper ACN extract was poured into a d-SPE tube containing 150 mg MgSO₄, 25 mg PSA and 25 mg C₁₈. The tubes were shaken on a vortex for 30 s and centrifuged at 12,000 rpm for 7 min. Then, 10 µL of the final ACN extract was directly injected into the LC system under the experimental conditions indicated in “MS and chromatographic conditions”. Quantification of samples was performed by external calibration with standards in solvent by applying the correction factors obtained in this work (see “Matrix effects”).

The procedure applied is shown in ESM Fig. S1.

Matrix effects evaluation

For evaluation of matrix effects, matrix-matched calibration was prepared for each matrix type by taking 450 µL of the blank sample extract and adding 50 µL of the corresponding standard in acetonitrile (between 25 and 5,000 ng/mL), resulting in final concentrations between 2.5 and 500 ng/mL.

Matrix effect was evaluated by calculating the percentage of signal suppression or enhancement using Eq. (1):

$$\text{Slopes difference} = \frac{\text{Matrix Calibration Slope} - \text{Direct Calibration Slope}}{\text{Direct Calibration Slope}} \times 100 \quad [1]$$

Then, correction factors were estimated for each sample matrix by using Eq. (2) (for details, see ESM Fig. S2):

$$F = \frac{1}{1 + \frac{\text{Slopes difference (\%)}}{100}} \quad [2]$$

In analysis of samples, the concentration of the pesticide residue was obtained by multiplying the concentration obtained after application of direct calibration with standards in solvent by the corresponding correction factor (see section 3.3. matrix effects).

Validation study

Fortification of samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of 0.1 or 1 mg/L standard mixture solutions in acetonitrile to 10 g homogenized blank sample in order to yield fortification levels of 0.01 or 0.1 mg/kg, respectively. The fortified samples were left to stand for 1 h prior to extraction.

Validation of the method was made on the basis of the EU SANCO (Directorate-General for Health and Consumer Protection) guideline [39]. Recovery experiments at two fortification levels, 0.01 and 0.1 mg/kg (in quintuplicate), were used to evaluate precision (repeatability, % RSD) and accuracy (percentage recoveries). The limit of quantification (LOQ) objective was the lowest concentration validated in fortified samples with satisfactory precision (RSD ≤ 20 %) and recovery (between 70 and 120 %).

Specificity was evaluated by analyzing a procedure blank, a processed blank sample, and a processed blank sample spiked at the LOQ level using the quantitative transition (Q).

The limit of detection (LOD) was estimated from the chromatograms of sample extracts fortified at the lowest level tested (i.e., 10 ng/mL) for a signal-to-noise ratio of 3.

Confirmation of the identity of the compound in samples was based on agreement in retention time (maximum deviation ±0.2 min between the analyte in sample and the reference standard), and on acquisition of two MS/MS transitions and the compliance of q/Q ratio with maximum tolerance of ±30 % [39].

RESULTS AND DISCUSSION

In a previous study, we developed analytical methodology for around 30 pesticides in seven tropical fruit matrices selected among the most important for the export market of Colombia: uchuva, maracuya, pithaya, tamarillo, gulupa, papaya, and granadilla [38]. The LOQ objective in that work was 0.05 mg/kg, which was satisfactory for most pesticide/matrix combinations in terms of MRL compliance. However, in a few cases the default MRL values are established in the present regulation at values lower than 0.05 mg/kg, commonly 0.01 and 0.02 mg/kg [2]. Also, metabolites are included in the residue definition for some pesticides. Therefore, the objective of the present work was to take a selection of pesticides commonly applied in Colombia and to update the analytical methodology in a higher number of tropical fruit matrices. The present work was focused only on those compounds from the previous list (Botero-Coy et al., 2012) that include metabolites in their residue definition (dimethoate, that includes its metabolite omethoate; thiamethoxam/clothianidin; carbofuran/3-hydroxy carbofuran; diuron/3,4-dichloroaniline; malathion/malaoxon; parathion methyl/paraaxon methyl). Two pesticides (benomyl and thiodicarb), that are applied in the field as precursors of carbendazim and methomyl respectively, were not considered in this work because of the unlikely presence of these compounds in the samples due to their conversion after application in the field and/or degradation along laboratory sample treatment to carbendazim and methomyl. Those compounds with MRLs default values for tropical fruits matrices below 0.05 mg/kg were also included in this work (dimethoate; picloram; carbofuran; clomazone; parathion methyl; malathion). Two pesticides, benomyl and thiodicarb, that are applied in the field as precursors of carbendazim and methomyl, respectively, were not considered in this work because of the unlikely presence of these compounds in the samples as a result of their conversion after application in the field and/or degradation during laboratory sample treatment to carbendazim and methomyl. Those compounds with default MRL values for tropical fruits matrices below 0.05 mg/kg were also included in this work (namely dimethoate, picloram, carbofuran, clomazone, parathion methyl, and malathion). Another three compounds were also added in relation to the previous work (imazalil, thiocloprid, thiabendazole) as they have been found in some tropical fruits [16, 22]. Altogether, 14 pesticides and six metabolites were selected to perform the present study (Table 1).

MS and chromatographic conditions

Mass spectra were acquired by infusion of 2.5 mg/L standards in methanol/water (50:50, v/v) at a flow rate of 10 μ L/min. For all compounds, better sensitivity was observed in the positive ESI mode, and the most abundant ion typically corresponded to the protonated molecule. Table 1 shows the cone voltage (V) finally selected to optimize the abundance of $[M+H]^+$.

The formation of sodium adducts (e.g., dimethoate, omethoate, picloram, paraoxon methyl, parathion methyl, malaoxon, 3,4-dichloroaniline, Diuron, clomazone, and chlorpyrifos), was minimized by adding formic acid and/or ammonium acetate, which favored the formation of the protonated molecule.

Once $[M+H]^+$ was selected as the precursor ion for all compounds, MS/MS experiments were carried out at different collision energies. Two transitions were finally selected: the most sensitive (Q) for quantification purposes and the second one (q) for confirmation of the identity (Table 1).

An Atlantis dC18 analytical column (5 μ m, 2.1 \times 100 mm) was selected in this study following the good results obtained in the previous work [38]. In order to optimize the chromatographic conditions, a mixed standard solution of the analytes at 50 ng/mL was used. First of all, MeOH and ACN were checked as organic solvents in the mobile phase. As the studied compounds were optimized in ESI positive mode, the presence of a protic solvent such as MeOH improved the sensitivity for all the compounds (with the exception of 3,4-dichloroaniline). Furthermore, the analytes' peak shapes were mostly better with MeOH than using ACN.

The initial percentage of organic phase (methanol) was fixed at 5 % for better retention in the C18 chromatographic column of the most polar compounds (e.g., omethoate). Although the extract injected into the LC-MS/MS (10 μ L) contained 100 % of organic solvent (acetonitrile), the peak shapes were acceptable. Just in the case of thiabendazole and carbendazim was a slight band broadening observed. The addition of mobile phase modifiers (HCOOH and NH₄Ac, both in water and MeOH) improved the peak shape and sensitivity for most of the studied compounds as revealed the infusion experiments carried out in previous

experiments. Therefore, different concentrations of ammonium acetate (0.05–1 mM) and formic acid (0.005–0.1 %) were tested in both the aqueous and organic phases. Finally, 0.1mM of NH_4Ac and 0.01 % of formic acid were selected as a compromise between satisfactory peak shape and sensitivity.

The chromatographic conditions selected were an Atlantis dC18 with MeOH/ H_2O (both 0.1 mM NH_4Ac and 0.01 % HCOOH) as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min, with a gradient in which the percentage of MeOH changed as follows: 0 min, 5 %; 1 min, 5 %; 10 min, 90 %; 13 min, 90 %; 14.1 min, 5 %. Under these conditions, the pesticides under study eluted at retention times from 5.7 min (omethoate) to 13.3 min (chlorpyrifos) (Table 1). The two MS/MS transitions per compound were distributed in individual functions in order to achieve a satisfactory number of points per chromatographic peak (at least 10). Under the final conditions selected, matrix-matched standards at 50 ng/mL were also injected to test the chromatographic behavior of the analytes in the matrices tested.

Table 1. MS/MS optimized conditions (ESI+) for the compounds and metabolites studied in this work.

Compound	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Cone (V)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)
Omethoate	5.70	214.3	25	10	183.1
(OME)				15	155
Carbendazim	6.75	192.1	30	15	160.1
(CAR)				30	132.0
Methomyl	6.98	163.1	20	10	88.0
(MTL)				10	106.0
Thiamethoxam	7.26	292.0	25	15	211.2
(THI)				25	181.2
Thiabendazole	7.56	202.3	35	25	175.1
(THB)				30	131.2
Picloram	7.87	241.1	25	20	195.2
(PIC)				30	168.0
Clothianidin	8.21	250.2	30	15	169.2
(CLOT)				15	132.0
3-Hydroxycarbofuran	8.38	238.3	30	10	181.2
(3-OH)				15	163.1
Dimethoate	8.48	230.1	25	10	199.1
(DIM)				20	125.0
Thiacloprid	9.07	253.2	35	20	126.0
(THC)				40	90.0
Paraoxon methyl	9.59	248.2	40	20	202.2
(PXON)				35	127.0
Imazalil	9.63	297.2	35	25	159.1
(IMA)		299.2		20	161.1
Carbofuran	9.98	222.2	30	10	165.1
(CRB)				20	123.1
Malaoxon	10.08	315.2	30	15	127.1
(MLX)				10	143.0
3,4-Dichloroaniline	10.56	162.1	30	20	127.0
(3,4-DCA)		164.1		20	129.0
Diuron	11.06	233.1	35	15	71.9
(DIU)		235.2		10	71.9
Clomazone	11.19	240.2	30	20	125.1
(CLO)		242.2		20	127.1
Parathion methyl	11.44	264.2	40	15	125.1
(PAR)				20	143.2
Malathion	11.69	331.1	30	15	127.0
(MAL)				10	285.0
Chlorpyrifos	13.37	350.0	30	20	198.1
(CHLOR)		352.0		20	200.1

Sample treatment

In this work, we applied the QuEChERS citrate-buffering version [46]. The d-SPE clean-up was performed with a mixture of MgSO₄, PSA, and C18. A schematic of the procedure applied is shown in ESM Fig. S1.

After application of the extraction step, two different clean-up systems were tested: a mixture of MgSO₄, PSA and C18; or a mixture of MgSO₄ and PSA. The addition of C18 together with PSA in the d-SPE step was reported to improve the clean-up for some samples, particularly those that contain lipids such as olives, and it does no harm in any case [44]. Although some chemists employ a freeze-out step to reduce lipid co-extractives, C18 in d-SPE is faster and easier, and has been shown to work equally well in removing lipids, although freezing out also precipitates additional matrix components having limited solubility in QuEChERS extracts [48].

Non-significant differences were found in recoveries and matrix effects among the two clean-up methods tested, although slightly better results were found for the mixture MgSO₄, PSA, and C18. Therefore, this was the approach used in this work. The results obtained for picloram were not satisfactory, as it could not be properly recovered after the QuEChERS procedure applied. The retention of this acidic analyte (pK_a 2.3) in PSA material was likely the main reason for the low recoveries. This is in agreement with the literature, as low recoveries for this compound were reported in food matrices [49, 50]. Degradation of picloram by amino or PSA sorbents was also suggested as the reason for the low recoveries consistently obtained when these columns are used with spiked extracts [50]. The low recoveries for acidic compounds when using PSA for clean-up has been widely reported [51].

Matrix effects

As stated in the “Introduction”, matrix effects are one of the main problems associated with LC-MS/(MS) methods. Among the different possibilities to minimize and/or compensate for this undesirable effect, the most popular in MRMs is the use of matrix-matched standards calibration. It is also common to select a few representative matrices to prepare matrix-matched standards when performing routine analysis of large numbers of samples, assuming that matrix effects are comparable between similar matrices [9, 29, 33, 34, 38, 44, 49].

In this work, a detailed study of matrix effects was performed by comparison of standards prepared in solvent and in matrix, a common way to test matrix effects. The comparison of slopes obtained from calibration curves constructed in the presence of matrix and in pure solvent has been also used to evaluate signal suppression or enhancement [9, 29, 44, 52]. Both, ionization suppression and enhancement were observed depending on the analyte/matrix combination under study. As an alternative to the use of matrix-matched standards calibration for every matrix analyzed, we tested a simple way that avoids the preparation of matrix-matched standards every time that a set of samples needs to be analyzed. The approach consisted of preparing the calibration curves for every analyte in solvent and in the 12 tropical matrices studied to evaluate whether ionization suppression or enhancement took place from the slopes of the calibration graphs. The differences in slopes between calibration in solvent and in matrix were calculated according to Eq. (1), and the correction factors were estimated for every analyte in every matrix using Eq. (2). These correction factors can be applied in future analysis, allowing one to perform analysis without the need for preparing new calibrations in matrix, just using standards in solvent.

As an illustrative example, Fig. 2 shows the differences in calibration graphs for several compounds investigated. From this figure, it is easy to appreciate the enhanced ionization for methomyl in several matrices, e.g., lulo, mangostan, and granadilla (Fig. 2a), the absence of matrix effects for dimethoate (only slight enhancement observed for lulo) (Fig. 2b), and the matrix suppression occurring in several matrices for thiacloprid (Fig. 2c) and in most matrices for chlorpyrifos (Fig. 2d).

The correction factors resulting from this experiment are summarized in Fig. 3. We assumed that no relevant matrix effect occurred when differences in slopes between calibration in matrix and in solvent were up to ± 20 %. Therefore, no correction was applied in those cases (un-colored boxes). Green/dark boxes refer to matrix enhancement effects (slope difference above 20 %), and yellow/ light boxes refer to matrix suppression effects (slope difference below -20 %).

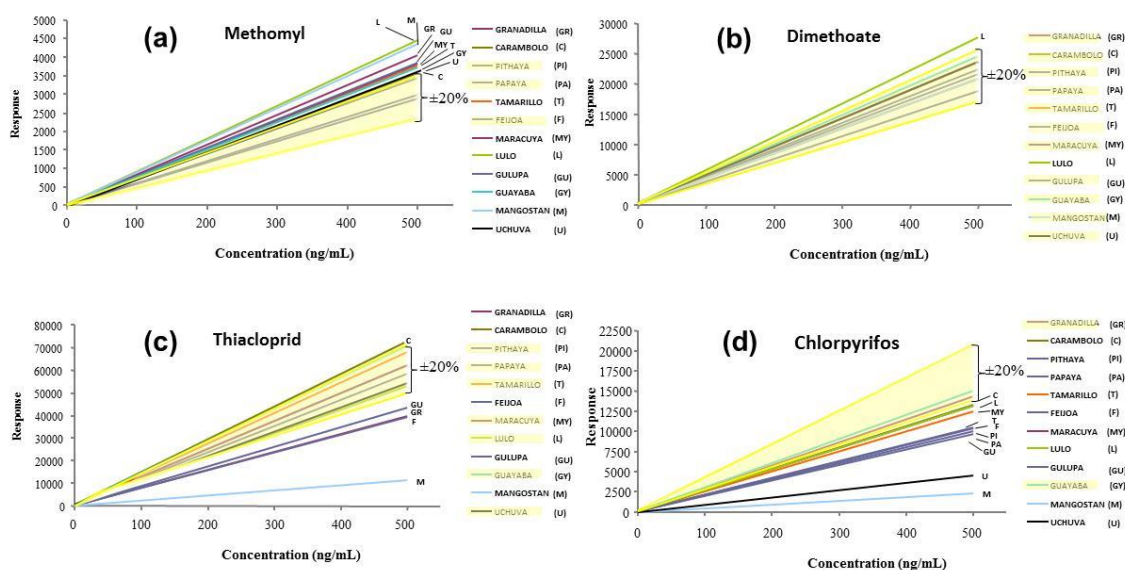


Fig. 2 Calibration graphs obtained for selected pesticides in different sample matrices. Calibration in solvent and $\pm 20\%$ tolerance in the slope is highlighted in yellow.

Omethoate and dimethoate were not much affected by matrix effects, nor was Diuron that only showed matrix suppression for mangostan. For several compounds, no signal suppression was observed for any of the matrices, and thus matrix effects, when present, led to only signal enhancement (methomyl, thiamethoxam, 3-OH carbofuran, thiabendazole, imazalil, and 3,4-dichloroaniline). It is worth noticing that imazalil and thiabendazole were affected by ionization enhancement in all matrices tested. The occurrence of important matrix effects for imazalil is in agreement with data reported by other authors [32].

In contrast, for a few compounds only signal suppression was observed, although not in all matrices (paraoxon methyl, carbofuran, clomazone, parathion methyl, and chlorpyrifos). Among these, parathion methyl and chlorpyrifos were affected by ionization suppression in nearly all matrices tested (11 out of 12, and 10 out of 12, respectively). Some other compounds were affected in both ways, showing matrix suppression for some matrices and matrix enhancement for others (carbendazim, clothianidin, thiacloprid, and malathion).

Compound	Granadilla	Lulo	Guayaba	Mangostan	Uchuva	Maracuya	Pithaya	Carambolo	Gulupa	Papaya	Tamarillo	Feijoa
Omethoate	11 (0.90)	-11 (1.12)	-10 (1.11)	-7 (1.08)	-2 (1.02)	20 (0.83)	-6 (1.06)	-3 (1.03)	13 (0.88)	-11 (1.12)	17 (0.85)	-8 (1.09)
Methomyl	39 (0.72)	53 (0.65)	27 (0.79)	49 (0.67)	26 (0.79)	31 (1.45)	18 (0.85)	22 (0.82)	32 (0.76)	2 (0.98)	29 (0.78)	-1 (1.01)
Thiametoxam	35 (0.74)	30 (0.77)	32 (0.76)	22 (0.82)	54 (0.65)	38 (0.72)	42 (0.70)	22 (0.82)	-3 (1.03)	7 (0.93)	28 (0.78)	9 (0.92)
Carbendazim	-18 (1.22)	-55 (2.22)	26 (0.79)	24 (0.81)	-15 (1.18)	-22 (1.28)	18 (1.22)	-8 (1.09)	-16 (1.19)	-58 (2.38)	10 (0.91)	-12 (1.14)
Clothianidin	-31 (1.45)	-2 (0.79)	23 (0.81)	-25 (1.33)	11 (0.90)	13 (0.88)	-15 (1.18)	36 (0.74)	-1 (1.01)	11 (0.90)	15 (0.87)	-7 (1.08)
3 OH Carbofuran	18 (0.85)	53 (0.65)	29 (0.78)	25 (0.80)	32 (0.76)	21 (0.83)	18 (0.85)	24 (0.81)	14 (0.88)	22 (0.82)	26 (0.79)	4 (0.96)
Dimethoate	-3 (1.03)	29 (0.78)	15 (0.87)	-3 (1.03)	10 (0.91)	10 (0.91)	5 (0.95)	10 (0.91)	-2 (1.02)	1 (0.99)	11 (0.90)	-12 (1.14)
Thiabendazol	145 (0.41)	94 (0.52)	153 (0.40)	103 (0.49)	145 (0.41)	53 (0.65)	178 (0.36)	221 (0.31)	37 (0.73)	169 (0.37)	155 (0.40)	153 (0.40)
Thiacloprid	-33 (1.49)	-11 (1.12)	19 (0.84)	-81 (5.26)	-9 (1.10)	4 (0.96)	-2 (1.02)	21 (0.83)	-27 (1.37)	4 (0.96)	14 (0.88)	-34 (1.52)
Paraoxon methyl	-37 (1.59)	-10 (1.11)	7 (0.93)	-74 (3.85)	-20 (1.25)	-11 (1.12)	-25 (1.33)	0 (1.0)	-53 (2.13)	-34 (1.52)	-8 (1.09)	-43 (1.75)
Carbofuran	-17 (1.20)	-10 (1.11)	-14 (1.22)	-51 (2.04)	-30 (1.43)	-12 (1.14)	-11 (1.12)	0 (1.0)	-17 (1.20)	-26 (1.35)	-18 (1.22)	-26 (0.85)
Imazalil	36 (0.74)	119 (0.46)	94 (0.52)	21 (0.83)	54 (0.65)	46 (0.68)	45 (0.69)	103 (0.49)	23 (0.82)	89 (0.53)	53 (0.65)	34 (0.74)
Malaoxon	-2 (1.02)	-21 (1.27)	-11 (1.12)	-33 (2.49)	-21 (1.27)	-24 (1.32)	1 (1.01)	-17 (1.20)	-15 (1.18)	-39 (1.64)	-20 (1.25)	-29 (1.41)
3,4 Dichloroaniline*	41 (0.71)	27 (0.79)	27 (0.79)	12 (0.89)	0 (1.0)	26 (0.79)	29 (0.78)	38 (0.72)	11 (0.90)	16 (0.86)	23 (0.81)	14 (0.88)
Diuron	17 (0.85)	11 (0.90)	10 (0.90)	-50 (2.0)	-7 (1.08)	12 (0.89)	-12 (1.14)	16 (0.86)	-2 (1.02)	-16 (1.19)	9 (0.92)	-13 (1.15)
Clomazone	6 (0.94)	9 (0.92)	10 (0.91)	-57 (2.33)	-50 (2.0)	4 (0.96)	-12 (1.14)	9 (0.92)	-7 (1.08)	3 (0.97)	5 (0.95)	-22 (1.28)
Parathion methyl	-40 (1.69)	-23 (1.30)	-30 (1.43)	-66 (2.94)	-34 (1.52)	-21 (1.27)	-25 (1.33)	-16 (1.19)	-47 (1.89)	-38 (1.61)	-26 (1.35)	-44 (1.79)
Malathion	23 (0.81)	6 (0.94)	45 (0.69)	-53 (2.13)	15 (0.87)	28 (0.78)	10 (0.91)	28 (0.78)	22 (0.82)	23 (0.81)	18 (0.85)	9 (0.92)
Chlorpyrifos	-17 (1.20)	-24 (1.16)	-13 (1.15)	-87 (7.69)	-74 (3.85)	-24 (1.32)	-40 (1.67)	-23 (1.30)	-44 (1.30)	-42 (1.72)	-28 (1.39)	-39 (1.64)

 \pm 0-20%
  > 20%
  < 20%

Fig. 3 Difference (%) between matrix calibration and direct calibration slopes. Correction factors (in brackets) were applied only when difference was higher than ± 20 % (green/dark boxes and yellow/light boxes).

Some trends were observed in relation to the matrix sample analyzed. For example, guayaba, carambolo, and tamarillo showed signal enhancement for almost all pesticides, whereas mangostan and feijoa led predominantly to signal suppression. The most difficult sample in terms of matrix effects was mangostan, where strong matrix effects were mostly observed.

The different behavior observed for compounds and food matrices under study showed that matrix effects were not homogeneous as a function of the chromatographic retention or the matrix analyzed, despite some trends being observed, as previously mentioned. Therefore, it does seem easy to predict the signal and extension of the matrix effects for each analyte/matrix combination.

Method validation

The usefulness of the approach used in this work was evaluated by calculating recoveries in fortified samples after applying the overall analytical procedure (i.e., process efficiency, which includes the extraction process recovery and the influence of matrix effects). Six matrices were selected and fortified (before extraction) at two concentrations, 0.01 and 0.1 mg/kg. Analyses were performed in quintuplicate, using calibration curves with standards in solvent that were introduced at the beginning and the end of each sequence of analysis of every matrix sample.

The process efficiency was calculated using the concentrations obtained by direct calibration (standards in solvent) and also after application of the corrections factors corresponding to the analyte/matrix combination under study (see Fig. 3). Correction factors were only applied when matrix effects were significant (i.e., differences in slopes above ± 20 %; green and yellow color boxes in Fig. 3), simulating the procedure that would be applied in routine analysis.

Figure 4 shows the results obtained in this experiment for the six matrices evaluated at the low concentration level tested (0.01 mg/kg). In general, the correction was satisfactory for all matrices, leading to recoveries in the range 70–120 %, and data were consistent at the two concentrations tested. One can easily visualize the satisfactory correction for granadilla for several pesticides whose recoveries were out of the 70–120 % range. However, after correction, recoveries reached the desired values for up to six pesticides that were not within the maximum tolerance before correction (thiamethoxam, clothianidin, thiabendazole,

thiacloprid, paraoxon methyl, and parathion methyl) (Fig. 4a). In tamarillo, four pesticides that were not within the maximum tolerance were satisfactorily corrected by applying the correction factors (Fig. 4b). The same occurred for eight pesticides in uchuva, the matrix for which correction was more significant (Fig. 4c); five pesticides in pithaya (Fig. 4d); five in maracuya (Fig. 4e); and six in gulupa (Fig. 4f). Apart from a few cases where the correction did not seem sufficient, the general trend was satisfactory.

3,4-Dichloroaniline (metabolite of Diuron) consistently showed recovery values below 70 % (mostly between 40 and 60 %) in four of the matrices tested (granadilla, tamarillo, uchuva, and pithaya). This might be explained because this analyte may form strong bonds with common substances present in vegetable matrices and/or due to partial degradation during the sample treatment, making its recovery poor with common extraction methods. Other authors also reported recoveries around 60–70 % for this compound in the LC–UV determination of linuron and three metabolites (3,4- dichloroaniline included) in potatoes [53]. A few compounds (carbendazim in three samples, and omethoate/dimethoate in maracuya) could not be validated because of the presence of the analyte in the “blank” sample used in method validation. Recovery data obtained are shown in ESM Table S2.

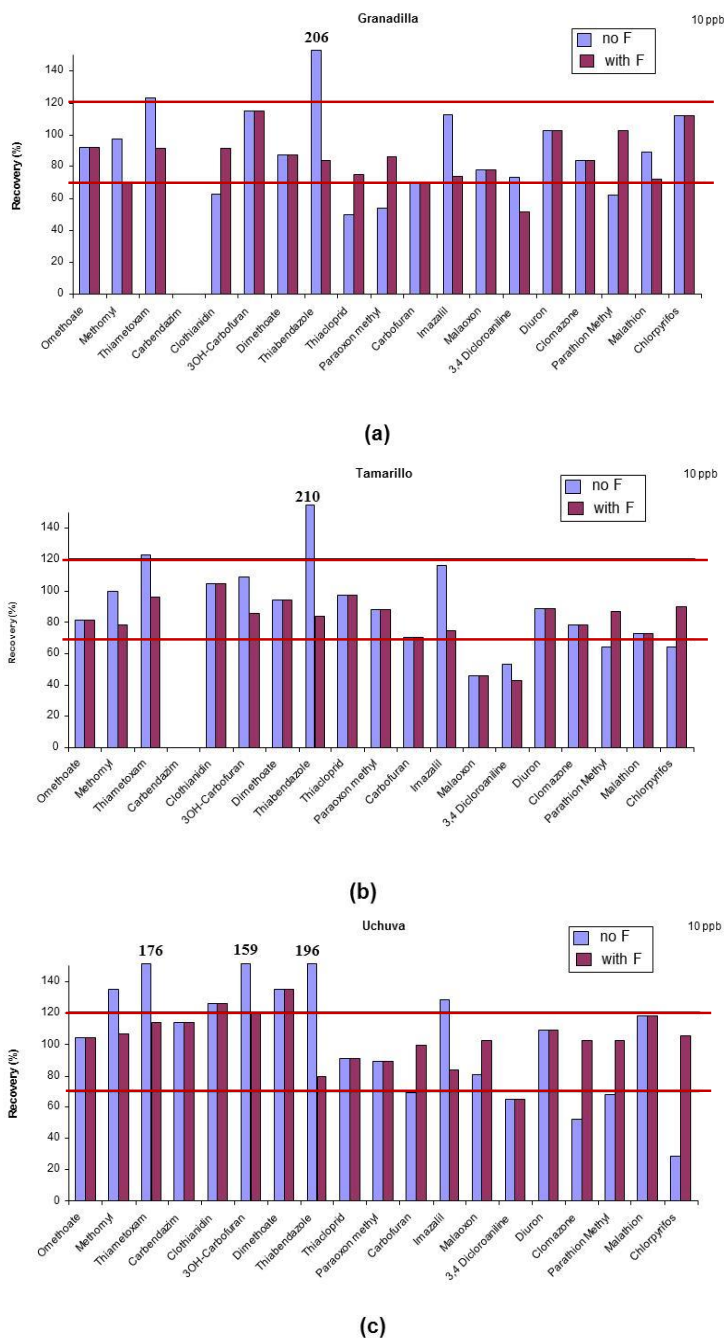


Fig. 4 Average recoveries for selected pesticides in different sample matrices after application of the overall analytical procedure. Recovery data correspond to samples spiked at 0.01 and 0.1 mg/kg, and were calculated using calibration with standards in solvent with and without application of correction factors (see Fig. 3 for correction factors).

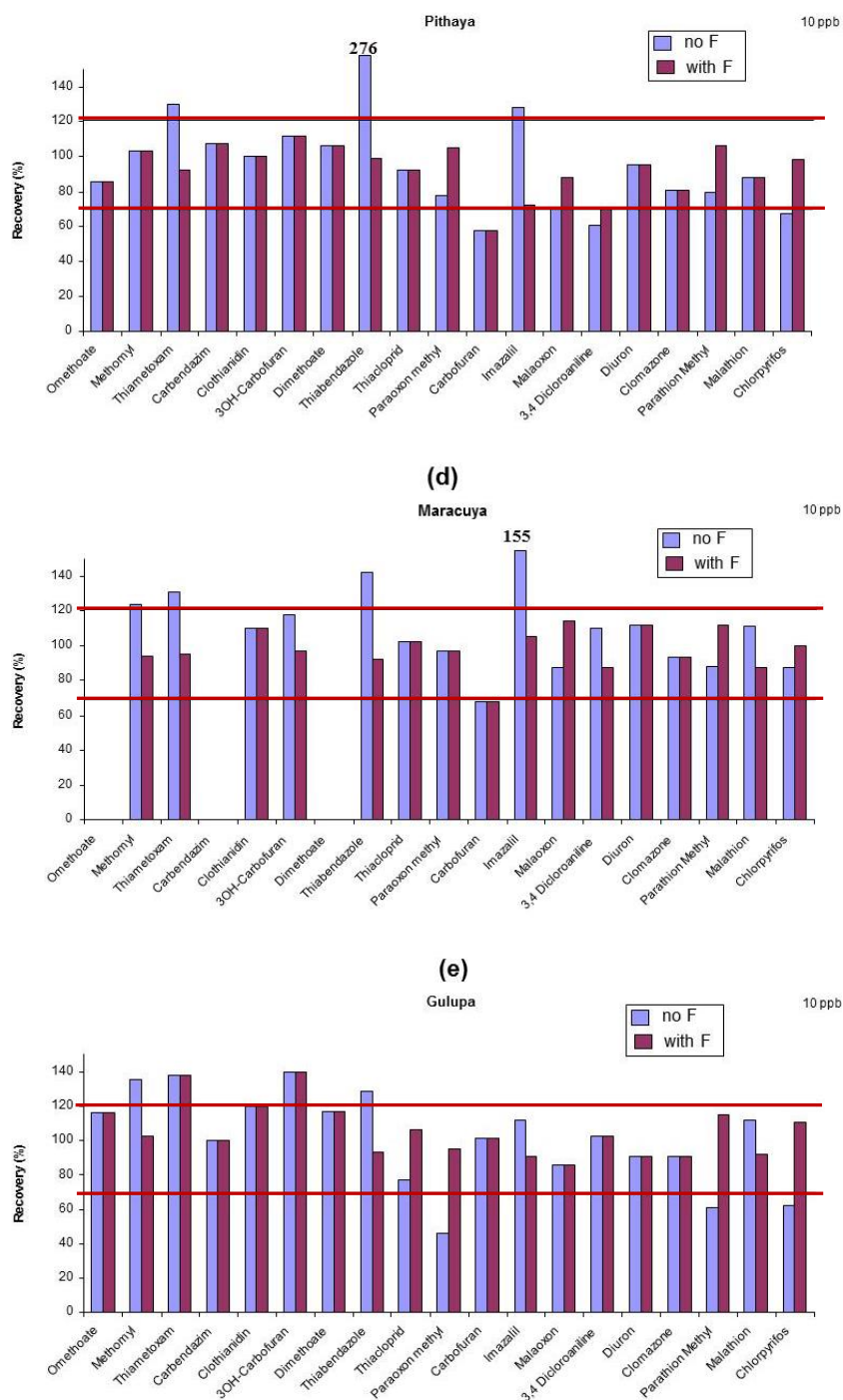


Fig.4 (continued).

Other parameters included in method validation were linearity of the calibration curve for standards in solvent, precision (expressed as repeatability, from recovery experiments), and limits of detection. The linearity was tested between 2.5 and 500 ng/mL (equivalent to 0.0025–0.5 mg/kg in sample). It was satisfactory in the majority of cases (commonly up to 250 ng/mL), with correlation coefficients above 0.99 and residuals lower than ± 20 %. The LOQ objective was established as the lowest concentration that was validated in a fortified sample after application of the overall analytical procedure. According to our data, the LOQ objective was 0.01 mg/kg for the majority of compounds (see Fig. 4, and ESM Table S2), as satisfactory recoveries (70–120 %) and precision (RSD < 20 %) were obtained at this level. No chromatographic peaks were observed in the processed blank samples; therefore, LODs as low as 0.5–3.0 $\mu\text{g/kg}$ (0.0005 and 0.003 mg/kg) were estimated for an S/N ratio of 3 depending on the analyte/matrix combination.

In addition to the validation performed for six selected matrices discussed above, the approach suggested in this work for matrix effects correction was supported by analysis of quality control (QC) samples that were included in the analysis sequence. QCs consisted of the same samples analyzed (12 samples from Spanish market and 12 samples collected directly from domestic Colombian markets) but previously fortified at 0.01 and 0.1 mg/kg. Thus, QC recoveries were obtained for all sample matrices, including those that were not subjected to validation (i.e., papaya, guayaba, feijoa, mangostan, lulo, and carambolo). In this way every sample was analyzed as a “blank” (without fortification) and after fortification at two concentration levels as QCs, as explained in the next section.

Analysis of samples from the Spanish and Colombian markets

A total of 24 samples were analyzed following the procedure developed in this work. Two samples were analyzed for each type of matrix: one collected in Spain (although imported from Colombia) and the other collected directly in Bogotá domestic markets. QC recovery data at 0.01 and 0.1 mg/kg allowed us to know whether the analytical methodology applied was adequate and whether matrix effects correction, using the correction factors previously calculated, was satisfactory. This was especially important for the six tropical matrices that had not been previously validated, and whose overall recoveries had not been calculated.

Data for QCs are shown in Table 2. As being an individual value, the acceptance criterion was 60–140 %, in line with the SANCO guideline for routine multi-residue analysis [39].

Table 2 Recoveries (%) obtained for quality controls (at 0.01 and 0.1 mg/kg level) that were analyzed in the sample sequence for six tropical fruit matrices

Pesticide	Matrix											
	Papaya		Guayaba		Feijoa		Mangostan		Lulo		Carambolo	
	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1
Omethoate	80	78	74	83	91	75	81	62	64	96	89	92
Methomyl	88	61	64	46	84	66	79	46	43	40	74	46
Thiamethoxam	121	101	96	74	112	99	78	60	60	70	130	100
Carbendazim	*	*	68	64	111	94	70	63	*	91	85	92
Clothianidin	128	110	80	70	107	98	66	67	69	73	116	87
3OH-Carbofuran	78	74	84	72	120	112	85	74	62	68	110	86
Dimethoate	97	93	101	89	107	101	92	80	66	78	123	105
Thiabendazole	74	51	70	60	75	66	62	50	133	78	76	60
Thiacloprid	98	92	104	85	112	98	83	84	61	67	104	79
Paraoxon methyl	153	155	120	111	150	150	95	82	89	93	140	123
Carbofuran	85	103	69	77	104	120	95	110	52	85	83	83
Imazalil	63	63	66	61	111	91	117	60	62	61	69	64
Malaoxon	111	105	71	67	107	99	85	92	70	103	77	74
3,4-Dichloroaniline	88	100	60	62	75	63	47	39	47	47	41	47
Diuron	83	84	110	96	109	100	106	77	86	90	128	109
Clomazone	89	90	98	86	116	110	112	89	78	87	111	92
Parathion methyl	97	85	100	81	131	89	77	83	76	85	116	72
Malathion	71	86	77	82	128	140	140	131	84	118	89	89
Chlorpyrifos	175	179	113	99	172	162	71	61	125	127	182	124

Concentrations calculated using calibration standards in solvent and applying the corresponding correction factors (see Fig. 3)

*Not determined because of the presence of analyte in unfortified sample

Among all QC analyses, individual recovery data were not available in three cases as a result of the presence of the analyte in the sample at relatively high concentrations (these cases corresponded to carbendazim in papaya and lulo). So, from 228 possible pieces of recovery data (corresponding to 19 compounds \times 6 matrices \times 2 levels), up to 225 QC recoveries were available. As shown in Table 2, 202 out of 225 pieces of data were within the acceptable range. This corresponded to 90 % of QC recoveries obtained. As expected from method validation for 3,4-dichloroaniline, several QC recoveries for this compound were not within the maximum tolerance (mangostan, lulo, and carambolo were around 40 %). Apart from this analyte, the exceptions were mostly observed for methomyl and chlorpyrifos (five pieces of data out of range), paraoxon methyl (four pieces of data), and thiabendazole (two pieces of data). Data for QCs in analyses of real-world samples, together with those obtained in method validation, support the applicability of the approach proposed in this work for matrix effects correction.

In relation to the positives found in samples, Table 3 shows a summary of data obtained. Eighteen detections were found in the 12 samples from Spanish markets (e.g., the lulo sample with five positives and maracuya with three), whereas 16 detections were observed in the 12 samples from Colombian domestic market (e.g., gulupa and carambolo with three positives each). In total, nine different compounds were detected and corresponded to four insecticides (methomyl, dimethoate, thiacloprid, and carbofuran), one fungicide (carbendazim), one herbicide (Diuron), and three metabolites (omethoate, clothianidin, and paraoxon methyl). As stated before, the LOQ objective was 0.01 mg/kg as the method was not validated at concentrations below this value. However, the sensitivity was sufficient to allow one to estimate concentrations in positive samples far below the LOQ objective. In those cases, we could estimate the concentration in sample as the signal obtained was above the S/N ratio of 10, commonly used as a statistical LOQ of analytical methods. These values are marked with an asterisk in Table 3.

Table 3 Pesticide concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in the tropical fruits analyzed

Sample Pesticide	Lulo	Carambolo	Granadilla	Mangostan	Tamarillo	Gulupa	Maracuya	Uchuva	Guayaba	Pithaya	Papaya	Feijoa
Omethoate	2.9(1)*	–	–	–	2.1(1)*	d(2)	42(1)	–	–	–	–	–
Methomyl	1.5(1)*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Carbendazim	1,340(1) 19(2)	2.1(1)* d(2)	660(1) –	3.5(1)* –	290(1) 80(2)	7.2(1)* 2.6(2)*	210(1) 30(2)	– d(2)	d(1) d(2)	– d(2)	3,400(1) –	d(1) 3.2(2)*
Clothianidin	–	–	–	–	2.2(2)*	–	–	–	–	–	–	–
Dimethoate	1.6(1)*	10(2)	–	–	–	2.0(2)*	160(1)	–	–	–	–	–
Thiacloprid	8.0(1)*	d(2)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Carbofuran	d(2)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	d(2)
Diuron	–	–	–	–	–	–	–	50(2)	–	–	–	–
Paraoxon methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	14(1)

*Estimated concentration corresponding to a response above the S/N ratio of 10 (below the LOQ objective of 0.01 mg/kg)

The compound most frequently detected, and at higher concentrations, was carbendazim that reached levels up to 3.4 mg/kg in papaya and was above 0.5 mg/kg in lulo and granadilla. This fungicide was mostly present in samples collected in Spain, which might imply that this compound was used as a post-harvest fungicide during storage and transport. Apart from carbendazim, the rest of the compounds did not exceed 0.1 mg/kg in samples, with the only exception of dimethoate in a maracuya sample.

In Fig. 5, several chromatograms of positive samples are shown as illustrative examples. In all cases, two transitions were acquired and the q/Q ion ratio was within the tolerances allowed ($\pm 30\%$) supporting the reliable identification of the compound detected in the sample.

The strategy proposed in this work is easily applied in other laboratories, which should estimate their own correction factors after performing an evaluation of matrix effects under their experimental conditions (as shown in “Matrix effects evaluation” and discussed in “Matrix effects”). After around 5 months that passed from matrix effects evaluation (estimation of correction factors) and analysis of the samples collected in Colombia, the correction factors were successfully applied to the QCs analyzed, showing the robustness of this approach in our laboratory. Correction factors would need to periodically be checked for possible changes in the MS and chromatographic conditions, and also for different varieties of each food product to ensure an appropriate correction.

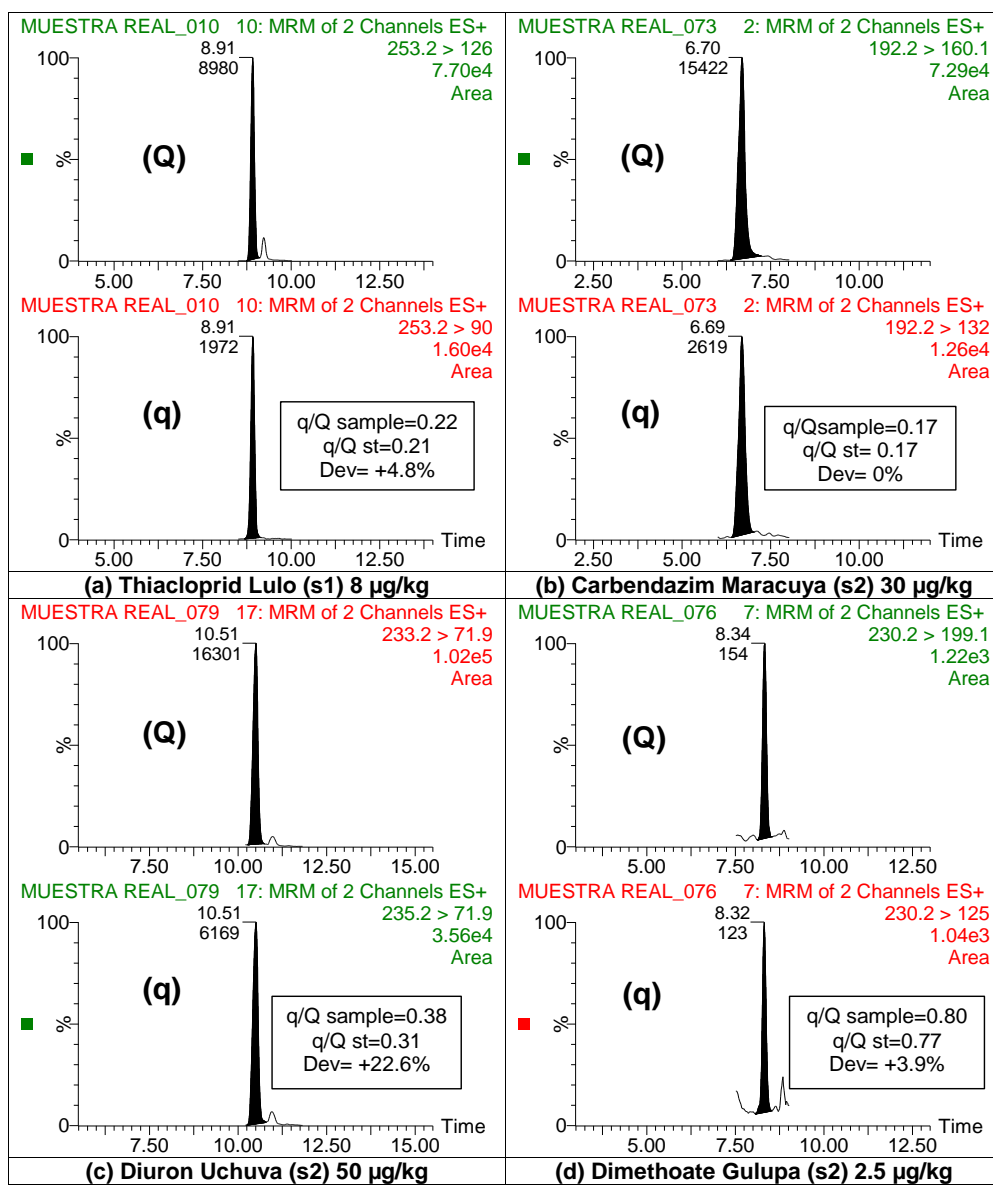


Fig. 5 Illustrative chromatograms for pesticides detected in tropical fruit samples. Q quantification transition, q confirmation transition. q/Q ratios in samples were within the maximum tolerances allowed in relation to those of reference standards.

CONCLUSIONS

Many multi-residue pesticide methods have been reported in the scientific literature for fruits and vegetables. However, few methods have specifically addressed tropical food, which may become a problem when assessing the compliance of maximum residue levels in these products. In this work, 12 tropical fruits which are very popular in Colombia, with increasing relevance in international trade markets (carambolo, feijoa, granadilla, guayaba, gulupa, lulo, mangostan, maracuya, papaya, pithaya, tamarillo, and uchuva), were selected for the LC–MS/MS determination of 20 pesticides and metabolites. After using a QuEChERS-based sample treatment with acetonitrile as the extracting solvent, a detailed study was performed on matrix effects associated with the LC–MS/MS analysis. A series of correction factors have been proposed for each analyte/matrix combination in order to facilitate the accurate quantification of the compounds using calibration standards in solvent. By application of appropriate correction factors there was no need to use either isotope-labeled internal standards or matrix-matched calibration in every sequence of sample analysis for matrix effects correction. The methodology developed was validated at 0.01 and 0.1 mg/kg levels in six sample matrices, and the usefulness of correction factors was tested in the rest of the matrices by evaluating recoveries of quality control samples included in every sequence of sample analysis. Analysis of samples collected in Spain (exported from Colombia) and directly in Bogota domestic markets revealed the presence of some of the compounds under study (mainly the fungicide carbendazim, the insecticide dimethoate and its metabolite omethoate, and the insecticide thiacloprid). With the exception of carbendazim (the maximum level found was 3.4 mg/kg in a papaya sample), the remaining positives were below 0.2 mg/kg, the majority of them being far below this value. MRLs set up by the EU for these compounds [2] were exceeded for carbendazim in four samples (papaya, lulo, granadilla, and maracuya, whose MRLs are between 0.1 and 0.3 mg/kg), for dimethoate in one maracuya sample (MRL 0.02 mg/kg), and Diuron in one uchuva sample (MRL 0.01 mg/kg). It is worth noting that MRLs for these tropical fruits are commonly set at the default value corresponding to the limit of determination because of the lack of GLP studies on residue trials for these matrices. This fact means that even small concentrations of pesticides in the samples may easily exceed the MRLs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support of Generalitat Valenciana (Research Group of Excellence Prometeo 2009/054 and Prometeo II 2014/023; Collaborative Research on Environment and Food-Safety, ISIC/2012/016).

- [1] FAO, Document BA/TF03/15. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental group of bananas and tropical fruits., (2003). <http://www.fao.org/corp>. Accessed Feb 2014.
- [2] European Union Decision, Regulation (EC) N° 396/2005 of The European Parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- [3] Exportación de frutas exóticas colombianas. Legiscomex, (2013). www.legiscomex.com/bancomedios/documentos/estudio_frutas_tropicales_Colombia. Accessed Jun 2014.
- [4] Botitsi H V, Garbis SD, Economou A, Tsipi DF (2011) *Mass Spectrom Rev* 30: 907–939.
- [5] Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B, (2006) *Mass Spectrom. Rev.* 25: 838–865.
- [6] Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 934–946.
- [7] Hernández F, Pozo OJ, Sancho JV, Bijlsma L, Barreda M, Pitarch E, (2006) *J. Chromatogr. A.* 1109: 242–252.
- [8] Pico Y, Vale D (2006) *Mass Spectrom. Rev.* 25:917–960.
- [9] Kmellár B, Fodor P, Pareja L, Ferrer C, Martínez-Uroz M, Valverde A, Fernandez-Alba AR (2008) *J. Chromatogr. A.* 1215: 37–50.
- [10] Camino-Sánchez FJ., Zafra-Gómez A, Oliver-Rodríguez B, Ballesteros O, Navalón A, Crovetto G, Vilchez JL (2010) *Food Addit. Contam. Part A.* 27: 1532–1544.
- [11] Grimalt S., Sancho JV, Pozo OJ., Hernández F (2010) *J. Mass Spectrom.* 45:421–436.
- [12] Kmellár B, Abrankó L, Fodor P, Lehotay SJ (2010) *Food Addit. Contam. Part A.* 27:1415–1430.

- [13] Marín JM, Gracia-Lor E, Sancho JV, López FJ, Hernández F (2009) *J. Chromatogr. A.* 1216: 1410–1420.
- [14] Soler C, Mañes J, Picó Y (2008) *Crit. Rev. Anal. Chem.* 38: 93–117.
- [15] Gebara AB, Ciscato C, Ferreira M, Monteiro S (2005) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 163–169.
- [16] Ciscato CHP, Gebara AB, Monteiro SH (2009) *Food Addit. Contam. Part B.* 2: 140–145.
- [17] Specht W (1992) *Manual of pesticide residue analysis*, DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft, Pesticides Commission. VCH, Weinheim, pp 317–322.
- [18] Banerjee K, Oulkar DP, Patil SB, Jadhav MR, Dasgupta S, Patil SH, Bal S, Adsule PG (2009) *J. Agric. Food Chem.* 57: 4068–4078.
- [19] Savant RH, Banerjee K, Utture SC, Patil SH, Dasgupta S, Ghaste MS, Adsule PG (2010) *J. Agric. Food Chem.* 58: 1447–1454.
- [20] Navickiene S, Aquino A, Bezerra DSS (2010) *J. Chromatogr. Sci.* 48:750–754.
- [21] Sundravadana S, Alice D, Samiyappan R, Kuttalam S (2008) *J. Braz. Chem.* 19: 60–63.
- [22] Hjorth K, Johansen K, Holen B, Andersson A, Christensen HB, Siivinen K, Toome M. (2011) *Food Control.* 22: 1701–1706.
- [23] Ramírez A, Gallo AF, Hoyos DE, Peñuela GA (2014) *Food Chem.* 158:153–161.
- [24] Taylor PJ (2005) *Clin. Biochem.* 38:328–34.
- [25] Niessen WMA, Manini P, Andreoli R (2006) *Mass Spectrom. Rev.* 25:881–899.
- [26] Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC (2010) *J. Chromatogr. A.* 1217:3929–3937.
- [27] Trufelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A (2011), *Mass Spectrom. Rev.* 30:491–509.

- [28] Cappiello A, Famiglini G, Palma P, Trufelli H (2010) *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33:1067–1081.
- [29] González-Antuña A, Domínguez-Romero JC, García-Reyes JF, Rodríguez-González P, Centineo G, García Alonso JI, Molina-Díaz A (2013) *J. Chromatogr. A* 1288:40–47.
- [30] Hewavitharana AK (2011) *J. Chromatogr. A* 1218:359–61.
- [31] Lucini L, Pietro Molinari G (2011) *J. Chromatogr. Sci.* 49:709–714.
- [32] Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR (2011) *J. Chromatogr. A* 1218:7634–7639.
- [33] Stachniuk A, Fornal E (2013) *Cent. Eur. J. Chem.* 11:1112–1131.
- [34] Kwon H, Lehotay SJ, Geis-Asteggianti L (2012) *J. Chromatogr. A* 1270:235–245.
- [35] Krueve A, Künnapas A, Herodes K, Leito I (2008) *J. Chromatogr. A* 1187:58–66.
- [36] Chung SWC, Chan BTP (2010) *J. Chromatogr. A* 1217:4815–4824.
- [37] Kittlaus S, Kempe G, Speer K (2013) *J. Sep. Sci.* 36:2185–2195.
- [38] Botero-Coy AM, Marín JM, Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 402:2287–2300.
- [39] Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document SANCO/12571/2013 (2014).
- [40] Pozo ÓJ, Sancho JV, Ibáñez M, Hernández F, Niessen WMA (2006) *Trends Anal. Chem.* 25:1030–1042.
- [41] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) *J. AOAC Int.* 86:412–431.
- [42] Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J, Barba A (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 389:1697–1714.

- [43] Wilkowska A, Biziuk M (2011) *Food Chem.* 125:803–812.
- [44] Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Wusheng Fu, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N (2010) *J. Chromatogr. A.* 1217:2548–2560.
- [45] Lehotay SJ (2007) *J. AOAC Int.* 90:485–520.
- [46] CEN, UNE-EN 15662, July 2008. Foods of plant origin. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QUECHERS- method.
- [47] España Amórtégui JC, Guerrero Dallos JA (2014) *Food Addit. Contam. Part A.* 31:676–687.
- [48] Lehotay SJ, Anastassiades M, Majors RE (2010) *Chromatography Online* <http://www.chromatographyonline.com/> (accessed March 2014).
- [49] Romero-González R, Aguilera-Luiz MM, Plaza-Bolaños P, Frenich AG, Vidal JLM (2011) *J. Chromatogr. A.* 1218:9353–9365.
- [50] Schenck FJ, Brown AN, Podhorniak LV, Parker A, Reliford M, Wong JW (2008) *J. AOAC Int.* 91:422–438.
- [51] Acidic pesticides using QuEChERS method; <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/acidicpesticides.pdf> (accessed January 2015)
- [52] Romero-González R, Garrido A, Martínez Vidal JL, Prestes OD, Grió SL (2011) *J. Chromatogr. A.* 1218:1477–1485.
- [53] Miliadis GE, Siskos PA, Vasilikiotis GS (1990) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73:435–437.

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

**Exploring matrix effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry
determination of pesticide residues in tropical fruits**

Ana María Botero-Coy, José M. Marín, Roque Serrano, Juan Vicente Sancho, Félix Hernández

Pesticide	Use	Metabolite	Granadilla	Maracuya	Gulupa	Mangostan	Tamarillo	Uchuva	Lulo	Carambolo	Feijoa	Guayaba	Pithaya	Papaya
Methomyl	insecticide		0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,02*
Thiamethoxam	insecticide	clothianidin	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,2	0,2	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*
Carbendazim	fungicide		0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,3	0,3	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,2
Dimethoate	insecticide	omethoate	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*
Thiacloprid	insecticide		0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,5	0,5	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,5
Thiabendazole	fungicide		0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	10
Carbofuran	insecticide	3-OH-carbofuran	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*
Imazalil	fungicide		0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,5	0,5	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*
Picloram	herbicide		0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*
Diuron	herbicide	3,4- dichloraniline	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*
Clomazone	herbicide		0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*
Malathion	insecticide-acaricide	malaaxon	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*
Parathion-methyl	insecticide, acaricide	paraaxon-methyl	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*
Chlorpyrifos	insecticide		0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,5	0,5	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*

*Limit of determination of the analytical method

Bold number indicate that GLP residue trials have been performed in order to set up the MRL

Table SI 1. Compounds and metabolites included in this work. Maximum Residue Limits (MRLs) as established in Regulation (EC) No 396/2005

Matrix	Granadilla		Tamarillo		Uchuva		Pithaya		Maracuya		Gulupa	
	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected
Pesticide												
Omethoate	103	103	84	84	108	108	85	85	84	84	117	117
Methomyl	106	76	103	80	136	109	104	104	127	97	129	98
Thiametoxan	137	101	108	84	161	104	122	86	136	99	104	104
Carbendazim	*	*	50	50	107	107	105	105	86	110	108	108
Clothianidin	70	102	96	96	127	127	94	94	118	97	114	114
3OH-Carbofuran	122	122	98	78	159	120	116	116	126	104	124	124
Dimethoate	92	92	88	88	131	131	104	104	97	97	110	110
Thiabendazole	204	83	184	74	187	76	242	87	125	81	57	71
Thiacloprid	53	79	88	88	87	87	92	92	95	95	69	95
Paraoxon methyl	55	88	77	77	84	84	76	102	93	93	44	94
Carbofuran	81	81	79	79	85	120	60	60	84	84	106	106
Imazalil	113	74	111	72	130	84	110	76	117	80	106	86
Malaoxon	86	86	55	55	98	124	77	77	96	127	92	92
3,4 Dichloroaniline	70	50	52	42	63	63	49	38	83	68	78	78
Diuron	104	104	84	84	107	107	92	92	110	110	87	87
Clomazone	88	88	77	77	52	104	81	81	95	95	87	87
Parathion Methyl	58	94	57	77	60	90	64	85	92	117	63	119
Malathion	103	83	79	79	127	127	96	96	118	92	115	94
Chlorpyrifos	73	73	59	81	28	102	55	92	76	100	64	114

* Data not available due to the presence of the analyte in the sample used for validation

Table SI 2a. Recoveries (%) obtained for the six matrices subjected to validation using concentrations calculated with direct calibration (*direct*) and corrected after application of the matrix effect factors (*corrected*). Fortification level 0.01 mg/kg (n=5)

Matrix	Granadilla		Tamarillo		Uchuva		Pithaya		Maracuya		Gulupa	
	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected	direct	corrected
Pesticide												
Omethoate	92	92	81	81	104	104	86	86	*	*	116	116
Methomyl	97	70	100	78	135	107	103	103	124	94	135	102
Thiametoxan	123	91	123	96	176	114	130	92	131	95	138	138
Carbendazim	*	*	*	*	114	114	108	108	*	*	100	100
Clothianidin	63	91	105	105	126	126	100	100	110	110	120	120
3OH-Carbofuran	115	115	109	86	159	120	112	112	118	97	140	140
Dimethoate	87	87	94	94	135	135	106	106	*	*	117	117
Thiabendazole	206	84	210	84	196	80	276	99	142	92	128	93
Thiacloprid	50	75	97	97	91	91	92	92	102	102	77	106
Paraoxon methyl	54	86	88	88	89	89	78	105	97	97	46	95
Carbofuran	70	70	70	70	69	99	58	58	68	68	101	101
Imazalil	113	74	116	75	129	84	128	88	155	105	112	91
Malaoxon	78	78	46	46	81	102	70	70	87	114	86	86
3,4 Dicloroaniline	73	52	53	43	65	65	61	47	110	87	102	102
Diuron	103	103	89	89	109	109	95	95	112	112	91	91
Clomazone	84	84	78	78	52	103	81	81	93	93	91	91
Parathion Methyl	62	103	64	87	68	103	80	106	88	112	61	115
Malathion	89	72	73	73	118	118	88	88	111	87	112	92
Chlorpyrifos	112	112	64	90	29	106	67	98	87	100	62	110

* Data not available due to the presence of the analyte in the sample used for validation

Table SI 2b. Recoveries (%) obtained for the six matrices subjected to validation using concentrations calculated with direct calibration (*direct*) and corrected after application of the matrix effect factors (*corrected*). Fortification level 0.1 mg/kg (n=5)

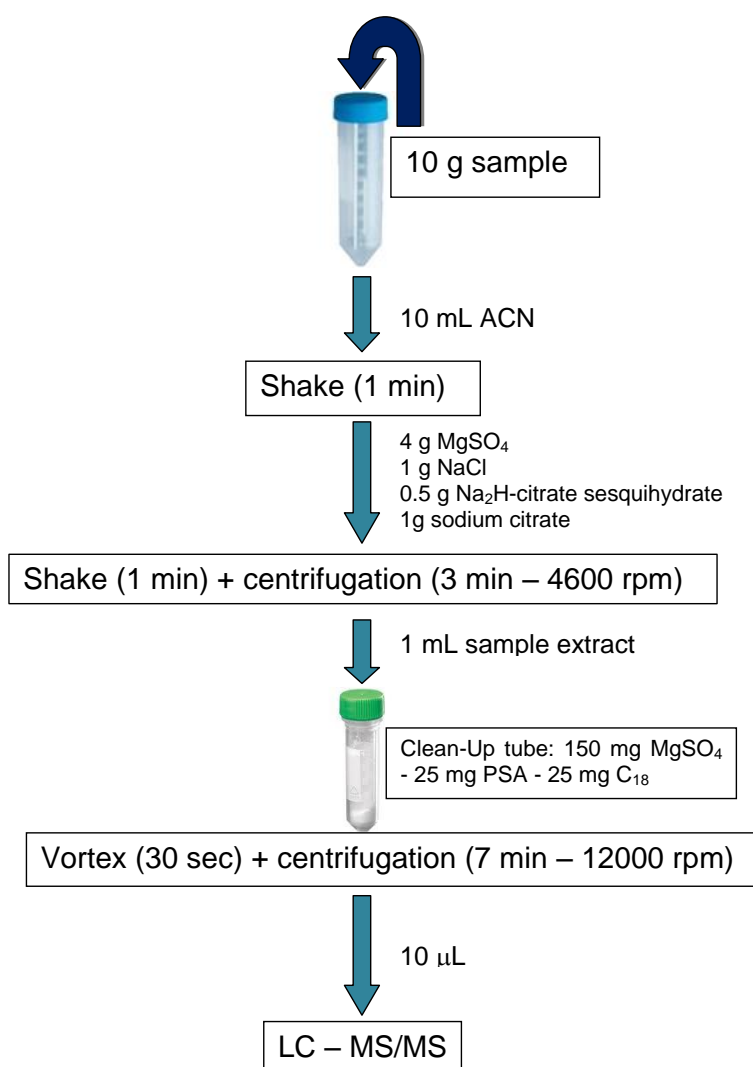
Figure SI 1. QuEChERS procedure applied in this work

Figure SI 2. Correction factor calculation

$$\frac{\text{Area}}{\text{Direct Slope}} \times F = \frac{\text{Area}}{\text{Direct Slope} + ((\% \text{ Difference} \times \text{Direct Slope})/100)}$$

$$\frac{F}{\text{Direct Slope}} = \frac{1}{\text{Direct Slope} + ((\% \text{ Difference} \times \text{Direct Slope})/100)}$$

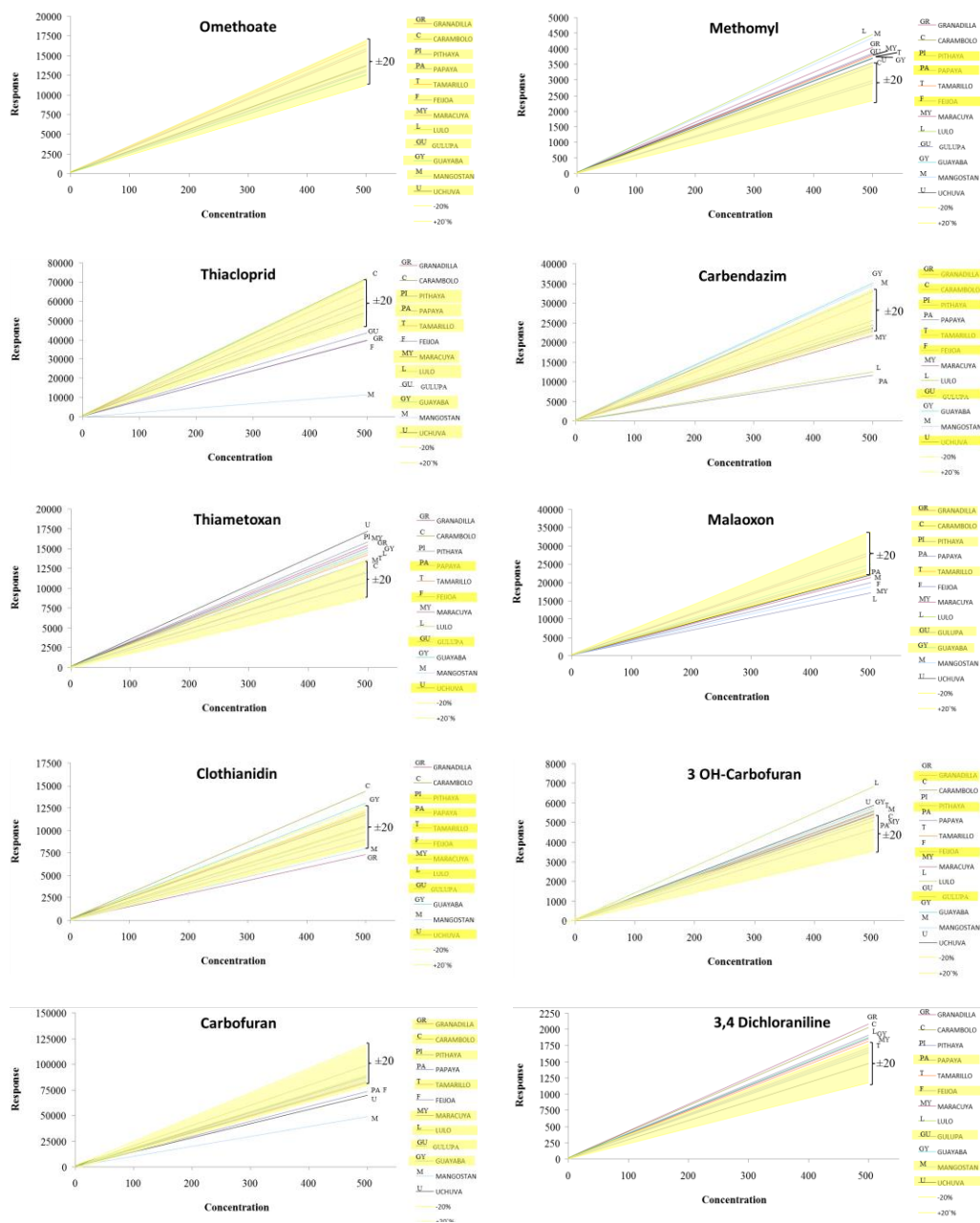
$$F = \frac{\text{Direct slope}}{\text{Direct Slope} + ((\% \text{ Difference} \times \text{Direct Slope})/100)}$$

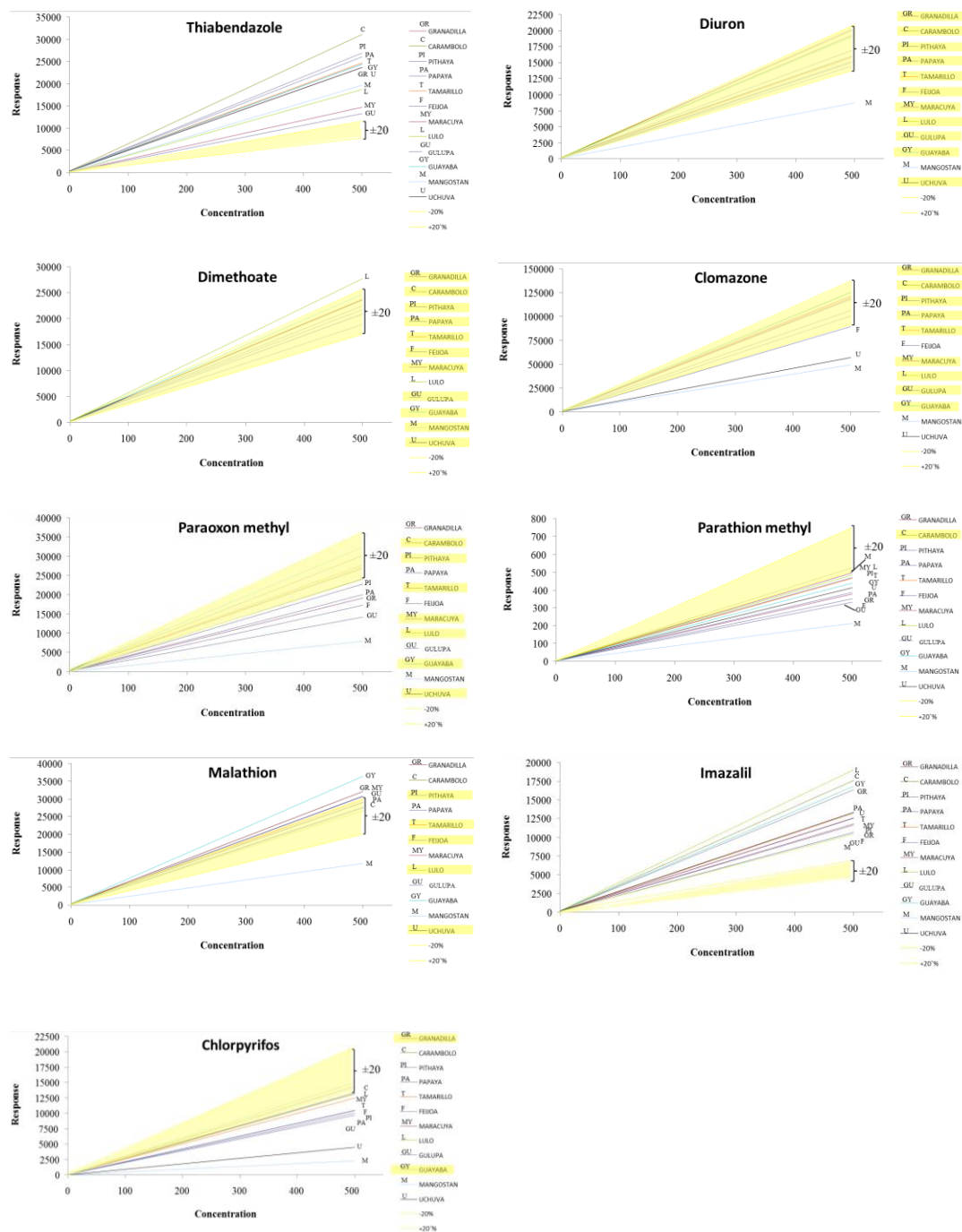
$$F = \frac{\text{Direct Slope}}{\frac{100 \times \text{Direct Slope}}{100} + \frac{(\% \text{ Difference} \times \text{Direct Slope})}{100}}$$

$$F = \frac{\text{Direct Slope}}{\text{Direct Slope} \times \left[1 + \frac{\% \text{ Difference}}{100} \right]}$$

$$F = \frac{1}{1 + \frac{\% \text{ Difference}}{100}}$$

Figure SI 3. Calibration graphs obtained for selected pesticides in different sample matrices. Calibration in solvent and $\pm 20\%$ tolerance in the slope is highlighted in yellow





2.1.4 Discusión de los resultados

A continuación, se discuten brevemente los resultados obtenidos en ambos métodos, organizando la discusión según los distintos apartados considerados en los *artículos científicos 1 y 2*.

Optimización de las condiciones MS/MS

Se obtuvieron los espectros de masas en modo “full-scan” para seleccionar los iones precursores, así como los espectros de iones productos (modo MS/MS), a diferentes voltajes de cono y energías de colisión, respectivamente. Los experimentos se realizaron mediante infusión en electrospray (ESI), tanto en modo positivo como en negativo. Se estudió el efecto de la adición de los modificadores acetato de amonio (NH_4Ac) y ácido fórmico (HCOOH), con objeto de favorecer la formación de la molécula protonada, intentando evitar la presencia de aductos sodiados $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que se formaban en la mayoría de los casos. Estos aductos no son recomendables en métodos MS/MS por su pobre e irreproducible fragmentación. A modo de ejemplo, en la **Figura 1 (artículo científico 1)** se muestra el efecto de la adición de estos modificadores en dos de los analitos seleccionados, imidacloprid y fludioxonil.

Debido a la ausencia de iones producto abundantes, en algunos compuestos con átomos de Cl se hizo uso de su distribución isotópica, seleccionando los iones correspondientes a las moléculas (de)protonadas con ^{35}Cl y con ^{37}Cl . Las transiciones para ^{37}Cl , en los analitos con un único átomo de Cl en su molécula, presentaron una intensidad aproximadamente la tercera parte de la correspondiente al ^{35}Cl , tal como corresponde a la distribución isotópica natural del cloro: ^{35}Cl (2/3) y ^{37}Cl (1/3). Esta filosofía de trabajo se aplicó a varios de los compuestos seleccionados, tal como se puede observar en la **Tabla 1 (artículo científico 1)**.

En la **Figura 2 (artículo científico 1)** se muestran, a modo de ejemplo, los espectros MS/MS optimizados para la atrazina, para la cual se seleccionaron las transiciones 216>174 (Q) y 218>176 (q).

La mayoría de los compuestos se determinaron con ESI en modo de ionización positivo (36 compuestos de 38) y solo dos en modo negativo (2,4D, fluazinam). En todos los casos, se seleccionó el ion precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ o $[\text{M}-\text{H}]^-$, excepto para el fungicida fludioxonil, para el cual

se seleccionó su aducto amoniado $[M+NH_4]^+$, ya que éste presentó mucha más abundancia que el ión protonado (**Figura 1, artículo científico 1**).

Se optimizaron dos transiciones por analito, con el fin de poder identificar con fiabilidad el compuesto detectado en las muestras. Normalmente, se eligieron los iones producto más abundantes para poder determinar los analitos a bajos niveles de concentración. En la medida de lo posible, se evitaron las transiciones poco selectivas (pérdidas de H_2O , CO_2) con el objeto de mejorar la selectividad del método y disminuir la posibilidad de interferencias por parte de compuestos coeluyentes que pudieran compartir la transición del analito, dando lugar a falsos negativos, ya que no se cumpliría la relación iónica (*ion ratio*) observada para los patrones.

Algunos de los compuestos seleccionados en el primer trabajo se incluyeron también en el segundo método desarrollado, junto con nuevos plaguicidas seleccionados por haberse reportado su presencia en algunas frutas tropicales. Así mismo, se añadieron también varios metabolitos incluidos en la definición de residuo. Siguiendo la misma estrategia de trabajo, se optimizaron las condiciones de MS y MS/MS (**Tabla 1, artículo científico 2**). Se estudió el efecto de los modificadores NH_4Ac y $HCOOH$, y se seleccionaron finalmente dos transiciones por compuesto, usando las correspondientes a ^{35}Cl y ^{37}Cl en varios de ellos incluidos en ambos métodos (clomazon, diuron, clorpirifos), así como en dos nuevos incluidos en el segundo método (imazalil y 3,4-dicloroanilina).

Optimización cromatográfica

En el desarrollo de un método multi-residuo es necesario llegar a un compromiso entre las condiciones de extracción de la muestra, la separación cromatográfica y, finalmente, la medida por MS, con el fin de poder determinar satisfactoriamente el mayor número de analitos. En este trabajo, se escogieron columnas cromatográficas de fase reversa (C_{18}), de elevada robustez y coste asequible. En primer lugar, se comparó el uso de dos columnas de este tipo, *Atlantis dC18* (5 μm , 2.1x100mm) y *Sunfire* (5 μm , 2.1x100mm). En cuanto a la fase móvil, se probaron gradientes con agua y dos disolventes orgánicos (MeOH y ACN), en ausencia y en presencia de distintos aditivos ($HCOOH$ y NH_4Ac) a diferentes concentraciones, intentando alcanzar un compromiso entre tiempo de retención, forma de pico y sensibilidad.

Para el primer método desarrollado (**artículo científico 1**) se seleccionaron las siguientes condiciones cromatográficas: columna *Atlantis dC18* (5 μ m, 2.1x100mm); fase móvil 0.01% HCOOH y 0.1mM NH₄Ac en metanol y 1mM NH₄Ac en agua, con un gradiente empezando en un 30% de fase orgánica y alcanzando hasta 90%. La adición de NH₄Ac mejoró notablemente la sensibilidad para los compuestos determinados en modo positivo, mientras que el HCOOH (0.01%) mejoró su separación cromatográfica y, al mismo tiempo, favoreció la retención en la columna de los compuestos ionizados en modo negativo. Los extractos de muestra inyectados contenían, tras el proceso de extracción y dilución, una proporción 15:85 (ACN:H₂O). En estas condiciones, los analitos eluyeron entre 2.2 min (metamidofos) y 11.1 min (pendimetalina). Con el fin de obtener buena reproducibilidad y forma de pico, con al menos 10 puntos por pico, las transiciones SRM se adquirieron distribuidas en una función por analito.

En el segundo método, se usó directamente la misma columna (*Atlantis dC18*) y la fase móvil optimizada fue MeOH: H₂O, ambos 0.01% HCOOH y 0.1mM NH₄Ac, con un gradiente desde 5% hasta 90% en MeOH. Los extractos de muestra inyectados, procedentes de la aplicación de QuEChERS, contenían en este caso un 100% de ACN. Bajo estas condiciones de trabajo, los analitos eluyeron entre 5.7 min (ometoato) y 13.3 min (clorpirifos). Igual que en el método anterior, se seleccionaron dos transiciones por compuesto y se distribuyeron en funciones individuales a lo largo del cromatograma para obtener suficientes puntos por pico cromatográfico.

Tratamiento de muestra

Nuestro principal objetivo en cuanto al tratamiento de muestra, tanto en el primer como en el segundo trabajo, aprovechando las ventajas de trabajar con instrumentación LC-MS/MS (alta sensibilidad, selectividad,...), fue reducirlo al máximo de tal manera que se minimizaran las posibles pérdidas y/o errores asociados a la manipulación de la muestra. De este modo, el trabajo se orientó hacia una rápida extracción, seguida de la inyección del extracto crudo o diluido directamente en el sistema.

En el primer método se escogió una extracción con ACN, usando trituración/homogeneización con Ultraturrax, siendo éste el procedimiento que se aplica habitualmente en nuestro laboratorio en la mayoría de procedimientos para ARP en vegetales. Tras la extracción se tomó una alícuota y se realizó una dilución x4 con agua y se inyectaron 20 μ L en el equipo de LC-MS/MS. El LOQ objetivo en este método fue 0.05 mg/kg.

El tratamiento optimizado en el segundo método se basó en una extracción por QuEChERS, procedimiento ampliamente aplicado en laboratorios de control. Se usó la versión Europea (CEN, 2008), basada en el uso de tampón citrato (en presencia de MgSO_4 y NaCl), y se aplicó una etapa de *clean-up* usando extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) con amina primaria-secundaria (PSA), C_{18} y MgSO_4 . En este caso, al no existir etapa de dilución como en el procedimiento anterior, se pudieron alcanzar límites de cuantificación menores. El LOQ objetivo en este segundo método fue 0.01 mg/kg. En la **Figura 2 (artículo científico 2)** se muestra un esquema del segundo método aplicado.

Estudio del efecto matriz

Uno de los puntos fuertes de los dos trabajos que se presentan en este capítulo fue el estudio detallado del ME para cada una de las muestras. En ambos casos, el ME se evaluó comparando patrones en solvente con patrones en extracto de muestra a igual concentración.

Desde el principio, y a pesar de ser conscientes de que se trata posiblemente de la mejor aproximación para corregir el indeseable efecto de la matriz, por motivos económicos y operativos se descartó el uso de patrones internos marcados isotópicamente (ILIS), ya que al tratarse de MRM hubieran sido necesarios un alto número de ILIS para asegurar una correcta corrección. El uso de adiciones estándar tampoco se consideró pues aumenta de forma considerable el número de muestras a analizar (al menos 3 o 4 adiciones) y además requiere conocer previamente la concentración aproximada del analito en la muestra con el objeto de ajustar las adiciones y minimizar el error en el cálculo por extrapolación. Por otro lado, también se descartó minimizar el ME mediante diluciones sucesivas, una posibilidad interesante y sencilla, pero inviable en nuestro caso debido a la limitada sensibilidad del instrumento utilizado, al tratarse de un equipo relativamente antiguo que no hubiera permitido alcanzar el LOQ objetivo. Tampoco se planteó la posibilidad de minimizar el ME aplicando tratamientos de muestra más intensivos, con etapas de purificación adicionales, pues se alargaría el procedimiento y podría conllevar mayores errores analíticos.

Finalmente, se optó por aplicar correcciones del ME basadas en el uso directo o indirecto del calibrado en matriz. Aunque el fundamento del procedimiento aplicado fue el mismo, sin embargo, el modo de corregir en el primer trabajo fue diferente al del segundo.

En el primer trabajo se evaluó el ME comparando patrones en solvente y en extracto de muestra (tres réplicas) a la misma concentración. Se observó tanto supresión como aumento de señal dependiendo de la combinación analito/matriz. El ME se calculó para cada analito como el promedio de la señal obtenida en el extracto fortificado, dividido por el promedio del patrón en solvente, ambos a la misma concentración (2.5 ng/mL). No se consideraron efectos matriz significativos cuando los valores se encontraban entre un rango de 70-120%.

Maracuyá, papaya, granadilla y uchuva fueron las frutas tropicales que presentaron menor ME, con excepción del insecticida monocrotofos, compuesto afectado por una notable supresión de señal. Imidacloprid, quinclorac, fluazinam, clorpirifos y pendimetalina mostraron exaltación en su respuesta cromatográfica. Gulupa, pitahaya y tamarillo (este último en menor medida) mostraron un comportamiento muy similar en cuanto al ME que generaban en la mayoría de los analitos. En general, se observó exaltación de la ionización para varios analitos en estas tres matrices.

En términos generales, la respuesta del insecticida monocrotofos se vio afectada por una fuerte supresión en todas las matrices estudiadas, mientras que los compuestos que eluían al final (fluazinam, butaclor, clorpirifos, pendimetalina) sufrieron un notable aumento en su señal cromatográfica (exaltación). Este hecho sugiere que al final del gradiente, con el porcentaje orgánico más elevado, eluyen componentes de la matriz que afectan negativamente al proceso de ionización de los analitos, siendo esta problemática más notable y difícil de resolver cuando se utilizan matrices análogas para efectuar el calibrado y no exactamente la misma matriz de fruta objeto de análisis.

Sobre la base del estudio del ME realizado (**Figura 3, artículo científico 1**), se clasificaron las matrices en tres grupos, y se propuso una estrategia de cuantificación basada en el uso de un único calibrado en matriz para distintos tipos de muestras. Así la gulupa, pitahaya y tamarillo se analizaron usando calibrado en matriz de gulupa; maracuyá, papaya y granadilla, usando calibrado de maracuyá; y uchuva, usando su propio calibrado en matriz. En las **figuras 2.3 (a,b,c)** se ilustra el comportamiento de los analitos en las distintas matrices estudiadas al cuantificar extractos fortificados usando calibrado en la matriz seleccionada en cada caso.

Analitos estudiados

1	Metamidofos	11	2,4 D	21	Propanil
2	Picloram	12	Atrazina	22	Terbutrin
3	Metomil	13	Diuron	23	Propiconazol
4	Tiametoxan	14	Azoxistribin	24	Ciprodinil
5	Monocrotofos	15	Clomazone	25	Pirimifos-metil
6	Imidacloprid	16	Ametrina	26	Fluazinam
7	Quinclorac	17	Paration-metil	27	Butaclor
8	Dimetoato	18	Pirimetanil	28	Clorpirifos
9	Carbendazina	19	Fludioxonil	29	Pendimetalin
10	Carbofuran	20	Malation		

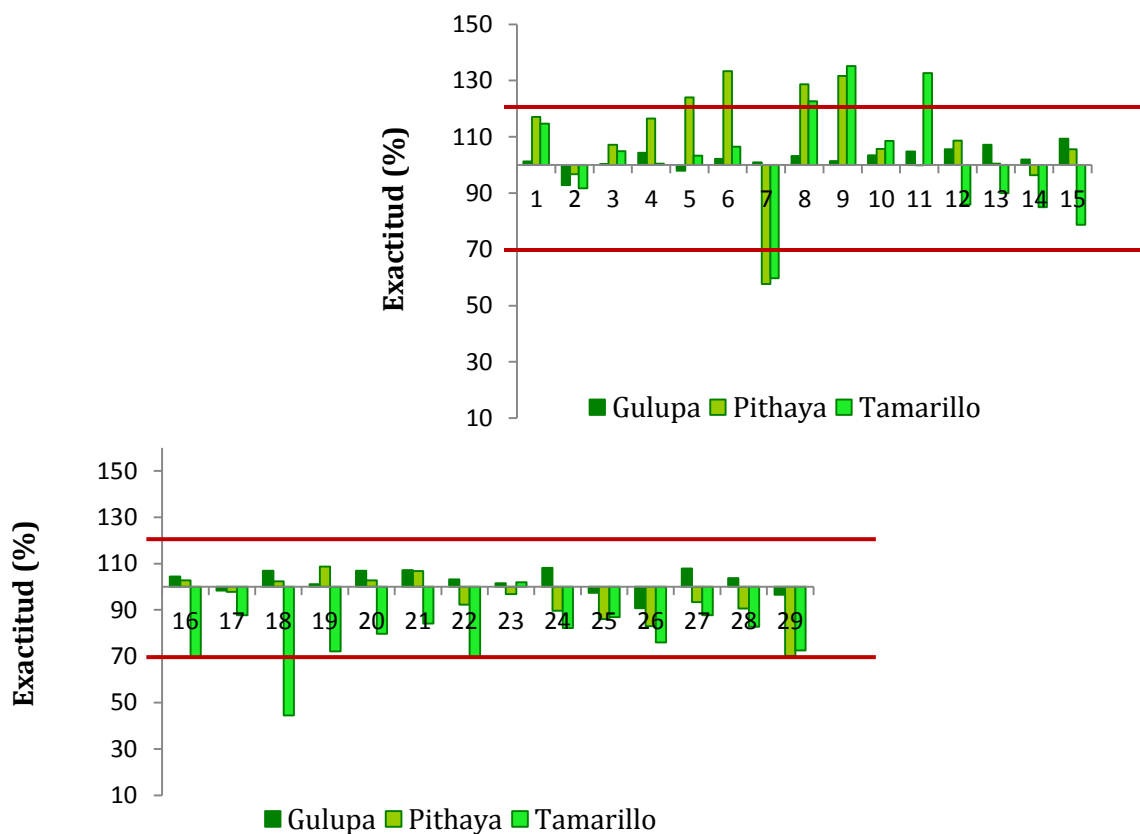


Figura 2.3a Resultados obtenidos al efectuar la cuantificación de los analitos usando calibrado en la matriz seleccionada.

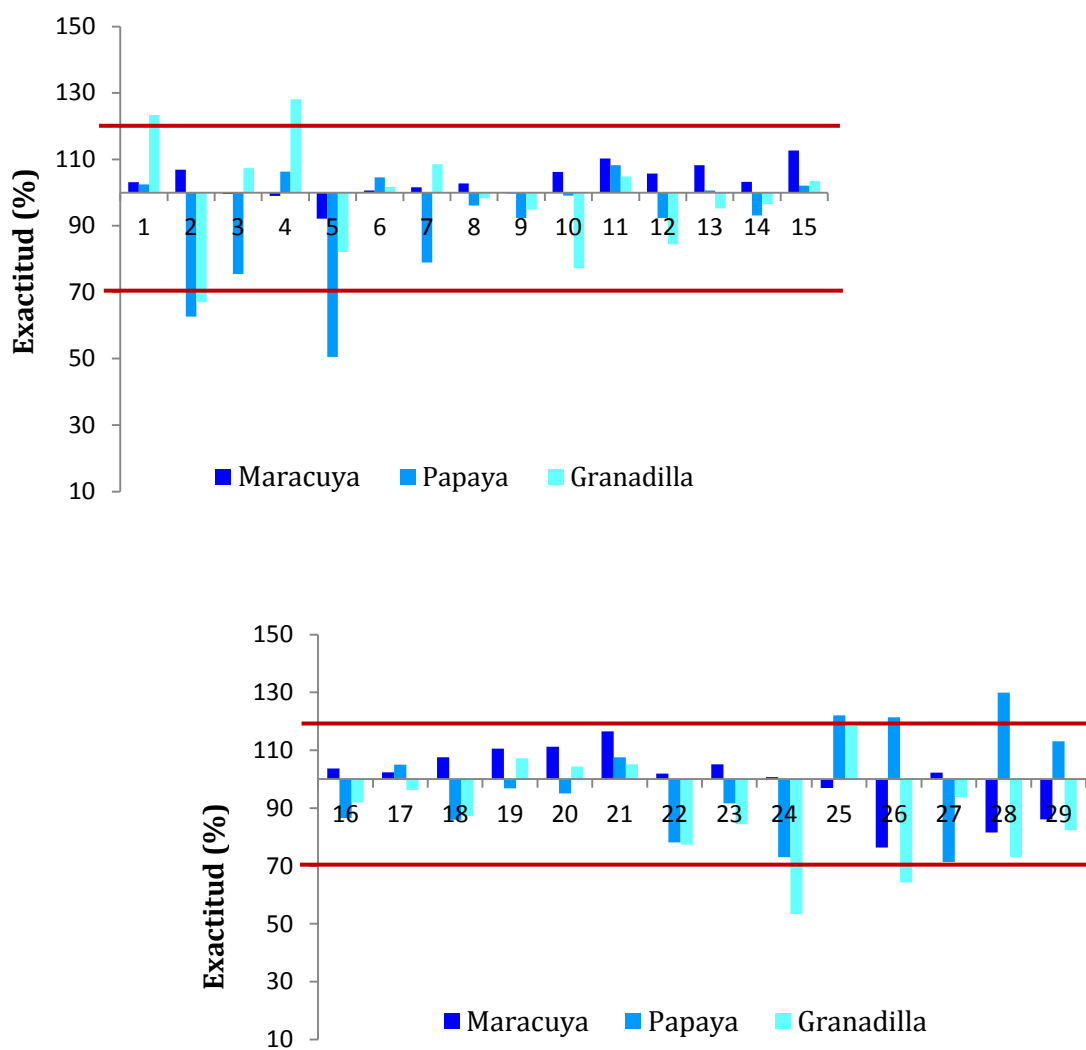


Figura 2.3b Resultados obtenidos al efectuar la cuantificación de los analitos usando calibrado en la matriz seleccionada.

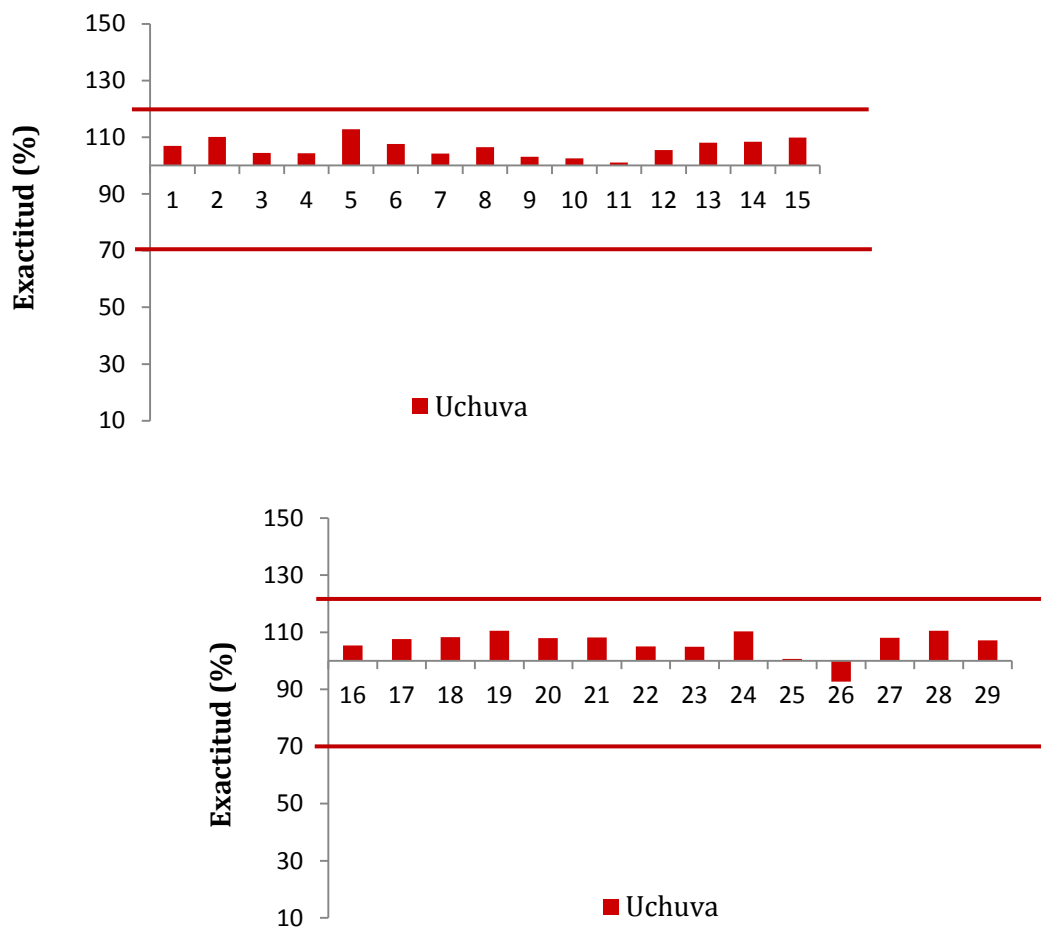


Figura 2.3c Resultados obtenidos al efectuar la cuantificación de los analitos usando calibrado en la matriz seleccionada.

En el segundo trabajo se prepararon calibrados en matriz para las 12 frutas tropicales estudiadas y estos se compararon con los obtenidos con patrones en solvente en el mismo rango de concentraciones. Con esta experiencia inicial se pudo evaluar, por un lado, el ME y, por otro, se pudieron proponer factores de corrección basados en las diferencias de pendientes entre calibrado en matriz y calibrado en solvente (*ecuaciones [1] y [2], artículo científico 2*).

La **Figura 3 y la Información Complementaria (artículo científico 2)** muestran las diferencias entre calibrados para todas las matrices estudiadas. En estas figuras se puede observar el aumento de la respuesta cromatográfica para metomilo en varias matrices como granadilla, lulo y mangostán; la ausencia de ME considerable para dimetoato; o la supresión de señal para tiacloprid en varias matrices y para clorpirifos en la mayoría de las frutas analizadas.

Los factores de corrección propuestos se muestran en la **Figura 4 (artículo científico 2)**. Estos factores se aplicaron únicamente cuando las diferencias entre las pendientes del calibrado en matriz vs calibrado en solvente fueron mayores del $\pm 20\%$, lo que implica asumir como aceptables recuperaciones del 80-120%. Con los factores de corrección propuestos, el análisis de muestras se puede realizar usando calibrado en solvente multiplicando las concentraciones obtenidas por el factor propuesto, obteniendo así la concentración final en la muestra. Se trata de un método muy sencillo y de fácil aplicación en análisis de rutina. Sin embargo, cabe señalar que su extrapolación directa a otro laboratorio requeriría determinar nuevamente los factores de corrección ya que éstos pueden ser instrumento-dependientes.

Para comprobar la fiabilidad de las dos aproximaciones usadas en el artículo científico 1 y 2, se validaron ambos métodos siguiendo las guías europeas SANCO. Además, se incluyeron en las secuencias de análisis de muestras reales múltiples muestras control de calidad (QC), con resultados, en general, muy satisfactorios como se muestra en el siguiente apartado.

Validación del método

La validación de los métodos se hizo de acuerdo con la guía SANCO vigente en cada momento. En el primer trabajo se utilizó el documento SANCO 10684/2009, mientras que en el segundo su usó como referencia el SANCO 12571/2013. Ambas guías utilizan los mismos criterios en cuanto a validación, siendo la principal diferencia la tolerancia admitida en el proceso de confirmación de la identidad del compuesto, es decir, en cuanto a las relaciones iónicas entre la transición de confirmación y la de cuantificación, y la tolerancia en el tiempo de retención entre el compuesto detectado en la muestra y el patrón de referencia.

En el documento SANCO 10684/2009 las tolerancias máximas en la relación q/Q frente al patrón de referencia depende de dicha relación, siendo desde $\pm 20\%$ para intensidades de señal relativas $>50\%$, hasta $\pm 50\%$ para intensidades relativas $\leq 10\%$ (**Tabla 2.6**). Estas tolerancias coinciden con las propuestas por la Decisión Europea 2002/657 referente a métodos analíticos y medidas de control para determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y productos derivados.

En el documento SANCO más reciente No. 12571/2013, cuya entrada en vigor fue el 1 de enero del 2014, se establece un único valor para la tolerancia de $\pm 30\%$ independientemente de la relación iónica.

Tabla 2.6 Tolerancias máximas recomendadas para las relaciones iónicas en el proceso de confirmación. Documento No. SANCO/10684/2009

Relative intensity (% of base peak)	EI-GC-MS (relative)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ (relative)
> 50 %	$\pm 10 \%$	$\pm 20 \%$
> 20 % to 50 %	$\pm 15 \%$	$\pm 25 \%$
> 10 % to 20 %	$\pm 20 \%$	$\pm 30 \%$
$\leq 10\%$	$\pm 50 \%$	$\pm 50 \%$

En cuanto a la tolerancia en la desviación entre el tiempo de retención en la muestra y en el patrón de referencia, en el documento SANCO 10684/2009 se establece un valor de $\pm 2.5\%$, mientras que el documento SANCO más reciente se establece una desviación máxima de ± 0.2 min.

En el primer método, el estudio de linealidad se llevó a cabo con disoluciones patrón en extracto de matriz, para un rango de concentraciones entre 1 y 100 ng/mL (equivalente a 0.02 y 2 mg/kg en muestra), con al menos 7 puntos, obteniendo resultados satisfactorios, con coeficientes de correlación ≥ 0.99 y residuales $\leq 30\%$, para la mayoría de plaguicidas en las tres matrices evaluadas (maracuyá, gulupa, uchuva). Los ensayos de recuperación, realizados mediante fortificación de muestras “blanco” (n=5), fueron satisfactorios a los dos niveles de concentración estudiados (0.05 mg/kg y 0.5 mg/kg), con las excepciones de picloram y quincloran (50-60%), así como algunos analitos que eluían en la parte final del cromatograma, como butaclor, clorpirifos y pendimetalina, que mostraron recuperaciones ligeramente superiores al 120% en algunas matrices y tan solo al nivel bajo de fortificación. Cabe recordar que la cuantificación se realizó mediante calibrado en matriz, pero usando tan sólo tres matrices representativas para todas las frutas tropicales analizadas (ver estudio del ME). En las muestras fortificadas que se analizaron con su propio calibrado en matriz las recuperaciones para estos compuestos fueron, como cabía esperar, satisfactorias. La muestra que presentó más complicaciones resultó ser el tamarillo, lo que sugiere que, para asegurar una mejor cuantificación, el calibrado debería hacerse con su propia matriz, en lugar de con gulupa. En lo que respecta a la precisión, el método presentó RSDs aceptables ($< 20\%$) a los dos niveles de fortificación ensayados.

Los resultados obtenidos en la validación del primer método se muestran en la **tabla 2 (artículo científico 1)**. El Limite de cuantificación (LOQ) objetivo se estableció como el nivel de fortificación más bajo validado con resultados satisfactorios (0.05 mg/kg) en la mayoría de combinaciones analito/muestra.

En cuanto al segundo método desarrollado, las experiencias de recuperación se llevaron a cabo a 0.01 y 0.1 mg/kg en seis matrices seleccionadas entre las 12 objeto de estudio (n=5 para cada nivel de fortificación), usando calibrado en solvente y aplicando los factores de corrección calculados en cada caso. El uso de factores de corrección fue satisfactorio ya que la mayoría de recuperaciones, que con calibrado en solvente quedaban fuera del rango 70-

120%, fueron corregidas al ser aplicados estos factores. Este hecho se ilustra en la **figura 4 (artículo científico 2)**. A modo de ejemplo, cabe indicar que en granadilla hasta seis analitos que presentaban recuperaciones fuera de tolerancia se pudieron corregir usando el correspondiente factor de corrección. En tamarillo los cuatro plaguicidas fuera del rango fueron satisfactoriamente corregidos usando los factores de corrección. En uchuva la corrección fue más notoria ya que fueron ocho los compuestos cuya recuperaciones fueron satisfactoriamente corregidas. En pitahaya y maracuyá fueron cinco plaguicidas y en gulupa seis. Los resultados obtenidos en la validación del método se muestran en la **información suplementaria (artículo científico 2)**. La linealidad se estudió entre 2.5 y 1000 ng/mL (equivalente a 0.0025 y 1.0 mg/kg en muestra) obteniendo resultados satisfactorios. El LOQ objetivo fue 0.01 mg/kg para la inmensa mayoría de combinaciones analito/muestra. Como ya se ha indicado anteriormente, la validación de este segundo método se realizó únicamente en seis matrices. Para las otras seis frutas tropicales estudiadas, el método se evaluó mediante análisis de QCs, que consistieron en las propias muestras analizadas pero fortificadas a dos niveles (0.01 y 0.1 mg/kg). Las recuperaciones obtenidas para los QCs fueron, en general, satisfactorias después de aplicar los factores de corrección (entre 60 y 140%, al tratarse de valores individuales; SANCO 12571/2013), lo cual soporta la validez de la aproximación utilizada en este trabajo.

Análisis de muestras

La aplicabilidad de la metodología analítica desarrollada en esta Tesis se comprobó mediante el análisis de muestras adquiridas en diversos mercados españoles y colombianos. En ambos trabajos, se analizaron del orden de 20 muestras, todas ellas procedentes de Colombia.

En el primer trabajo, se detectaron varios positivos, aunque el único compuesto que se encontró a concentraciones superiores a 0.05 mg/kg (LOQ objetivo del método), fue el fungicida carbendazima en una muestra de tamarillo. El resto de positivos, todos ellos a niveles inferiores a 0.05 mg/kg, correspondieron a pirimetamil (gulupa), imidacloprid y monocrotofos (maracuyá), carbendazima (granadilla) y malation (pithaya). En las **figuras 5 y 6 (artículo científico 1)** se muestran cromatogramas ilustrativos de algunos de estos positivos encontrados en los análisis. Todos ellos se confirmaron mediante el tiempo de retención, la adquisición de dos transiciones y el cumplimiento de la relación iónica q/Q.

Cabe destacar en este trabajo el estudio que llevamos a cabo sobre la interferencia encontrada para el malation en varias de las muestras analizadas. La transición usada para la confirmación (331>99) parecía estar interferida por un componente de la matriz. Se hizo un estudio mediante QTOF sobre dicho interferente, usando medidas de masa exactas. Aunque el interferente no pudo ser identificado, se comprobó que, en efecto, compartía la masa nominal y varios fragmentos con el malation, pero sus masas exactas diferían en cerca de 60 mDa (**Figura 7, artículo científico 1**). Finalmente, la adquisición de una tercera transición en el método MS/MS (331>125) permitió resolver este problema, al no estar interferida, evitando así la posibilidad de reportar falsos negativos por el incumplimiento de la Q/q ratio.

En el segundo trabajo, se analizaron un total de veinticuatro muestras, dos de cada tipo de fruta tropical: una de ellas adquirida en supermercados españoles y la otra comprada directamente en un mercado de Bogotá. Cada una de las muestras se analizó también con sus correspondientes controles de calidad, fortificándolas a niveles de 0.01 y 0.1 mg/kg. De esta forma, las recuperaciones de los QCs permitieron comprobar el uso correcto de los factores de corrección propuestos. Esto fue particularmente importante para las seis matrices que no habían sido previamente validadas.

En la **tabla 2 (artículo científico 2)** se muestran los valores de recuperaciones para los QCs. El 90% de estos valores se encontró dentro del rango 60-140% aceptado por la guía SANCO, lo cual soportó el uso de los factores de corrección propuestos en esta tesis.

Se encontraron en total dieciocho positivos en las doce muestras adquiridas en España, destacando lulo con cinco y maracuyá con tres. En las doce muestras de Colombia se encontraron dieciséis positivos, destacando gulupa y carambolo con tres positivos cada una. En total se detectaron nueve compuestos: cuatro insecticidas (metomilo, dimetotao, tiacloprid y carbofuran), un fungicida (carbendazima), un herbicida (diuron) y tres metabolitos (ometoato, clotianidin y metil paraoxon). El compuesto más frecuentemente encontrado, y a mayores concentraciones, fue el fungicida carbendazima (3.4 mg/kg en papaya y alrededor de 0.5 mg/kg en lulo y granadilla). La gran mayoría de positivos se encontraron por debajo de 0.2 mg/kg. Los MRLs establecidos por la EU se superaron para carbendazima en cuatro muestras (papaya, lulo, granadilla, maracuyá), para dimetoato en una muestra de maracuyá y para diuron en una muestra de uchuva. En la **tabla 2.7** se muestran los casos en los que se superaron los MRLs establecidos por la EU.

Tabla 2.7. Límites Máximos de Residuos superados en el análisis multi-residuo de veinticuatro muestras de frutas tropicales.

Plaguicida	Muestra	Concentración (mg/kg)	MRL (mg/kg)
Carbendazima	Papaya	3.40	0.2
	Lulo	1.34	0.1*
	Granadilla	0.66	0.1*
	Maracuyá	0.21	0.1*
Dimetoato	Maracuyá	0.16	0.02*
Diuron	Uchuva	0.05	0.01*

* Valor por defecto correspondiente al límite de determinación del método analítico.

Cabe destacar que, de los seis casos en los que se superó el MRL, en cinco de ellos este valor correspondía al límite de determinación del método analítico (señalado con *), lo cual denota la falta de estudios BPLs de residuos para muchas frutas tropicales. Esto se ilustra claramente en la **tabla SI1 (información suplementaria, artículo científico 2)** en la que se presentan los MRLs para los plaguicidas seleccionados en el estudio realizado en las doce frutas tropicales.

Es de esperar que en un futuro no muy lejano se realicen los estudios BPLs necesarios para establecer nuevos MRLs para la mayoría de frutas tropicales, con el fin de facilitar su exportación a Europa. Por otra parte, deberían existir más controles en cuanto al uso adecuado de estos compuestos, pues como se dijo anteriormente se han detectado varios positivos. Muchos de estos positivos corresponden a compuestos que actualmente no están admitidos en la EU, como es el caso de la carbendazima, carbofuran y monocrotofos, siendo la carbendazima el compuesto que más veces supera los MRLs.

2.2. Método multiresiduo para la determinación de plaguicidas en suelos Argentinos

2.2.1 Introducción

El suelo es uno de los principales recursos naturales que ofrece nuestro planeta. A medida que crece la población mundial, y a la vez sus necesidades alimentarias, aumenta también la necesidad de mantener y/o incrementar la capacidad de producción de los suelos en lo relativo a los cultivos. Para asegurar la producción de la cantidad adecuada de alimentos, habitualmente se requiere del uso de plaguicidas procurando mantener un equilibrio entre cultivos saludables, plagas, enfermedades y malezas que, a menudo, los atacan. Aunque existe una fuerte tendencia hacia la agricultura biológica (ecológica), los plaguicidas siguen jugando un papel muy importante favoreciendo la alta producción con los niveles de exigencia actualmente requeridos. El control integrado de plagas, en donde se limita el uso de productos químicos a los casos estrictamente necesarios, combina la lucha química con otros mecanismos, como el control biológico de plagas, sistemas mecánicos de tratamiento, etc... Esta práctica parece ser la más vanguardista en la actualidad (Generalitat Valenciana, 2014).

El suelo termina siendo el receptor principal de la mayoría de productos fitosanitarios, bien por su aplicación directa (p.e. herbicidas, insecticidas sistémicos,...), o indirectamente al aplicarse sobre los cultivos. Algunos plaguicidas se degradan rápidamente en el suelo, mientras que otros pueden persistir durante períodos más largos, desde unos pocos días hasta varios años. El tipo de suelo afecta, sin duda, a la persistencia de los plaguicidas (Andreu, 2004). La materia orgánica (SOM) es uno de los parámetros que más influye en los procesos de degradación aunque hay otros factores como la climatología (radiación solar, temperatura, lluvias,...) cuyos efectos en estos procesos son también notables (Albers, 2009).

Además de la degradación, ocurren otros fenómenos importantes que afectan al destino final del plaguicida y que tienen relevancia en su posible efecto ambiental. La adsorción del plaguicida en el suelo hace que permanezca durante más tiempo en él, siempre que no haya degradación importante, y evita la lixiviación del compuesto hacia las aguas subterráneas. A pesar de ello, un plaguicida adsorbido sobre el suelo puede llegar a contaminar las aguas

superficiales por fenómenos de escorrentía superficial, cuando se producen fuertes lluvias o cuando se aplica riego por inundación, al arrastrar las partículas de suelo contaminadas hacia los cauces superficiales.

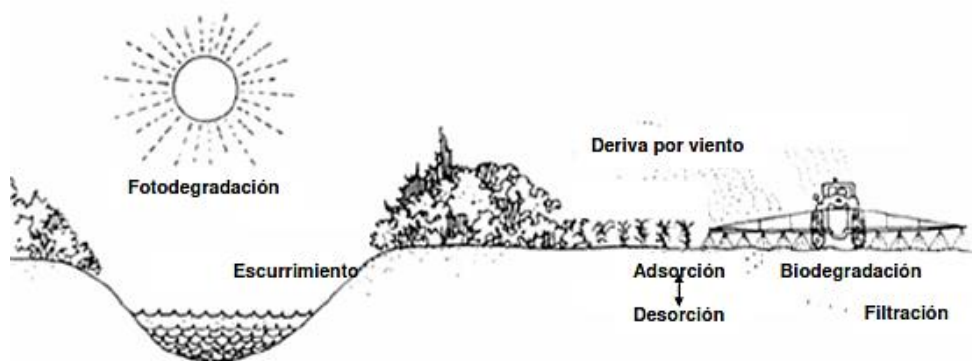


Figura 2.4. Posibles procesos que pueden sufrir los plaguicidas en los suelos (Solange, 2011)

Aunque no resulte fácil generalizar, se podría decir que los compuestos menos polares tienen tendencia a quedar retenidos en los suelos por adsorción, principalmente sobre las arcillas y óxidos de hierro y aluminio, mientras que los compuestos más polares suelen tener mayor tendencia a la lixiviación, pudiendo llegar a contaminar más fácilmente las aguas subterráneas (Andreu, 2004; Hernández, 2012; Nimer, 2007).

El uso continuado de grandes cantidades de plaguicidas representa una potencial amenaza para el medio ambiente, incrementándose el riesgo para la salud pública si no se siguen las BPA, que incluyen aplicación de las dosis recomendadas y respeto de los plazos de seguridad. Aun así, en los compuestos más persistentes, parte de sus residuos pueden quedar ampliamente distribuidos en cosechas, suelos, aguas y en los lugares aledaños a su uso, provocando contaminación y problemas medioambientales; de ahí que el uso de estos compuestos esté cada vez más restringido. Por otro lado, si no se siguen los principios de las BPA se posibilita la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos a niveles más altos de

los esperados, que al ser ingeridos podrían afectar a la salud del consumidor (Aulagnier, 2008; Cerejeira, 2003; Homazava, 2014).

Mientras la problemática de residuos en alimentos está, en general, bien estudiada y existen regulaciones severas al respecto, con establecimiento de MRLs, el impacto ambiental de los plaguicidas está menos regulado. En el caso de las aguas, existen límites máximos permitidos en aguas potables (Directiva/83/1998), y también normas de calidad ambiental, que aplican a unos pocos plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas (Directiva/105/ 2008). Por el contrario, la problemática de los plaguicidas en suelos apenas dispone de regulación, sin existir, desde nuestro conocimiento, niveles máximos permitidos. Este hecho hace que, a diferencia de alimentos y aguas, donde suele existir un LOQ objetivo para la metodología analítica desarrollada, en los suelos no existe un consenso en cuanto al LOQ que se debe alcanzar. No obstante, la guía SANCO/825/00, que hace referencia a los parámetros de validación de los métodos analíticos para residuos de plaguicidas, en su apartado de “métodos analíticos para análisis de residuos en suelos” sugiere que el LOQ en suelos debería ser usualmente de 0.05 mg/kg.

Argentina es uno de los principales productores de alimentos, en particular de cereales, siendo un país agrícola por excelencia, que basa gran parte de su economía en la siembra y producción de cultivos. Los plaguicidas representan un importante insumo productivo observándose un crecimiento notable en el uso de estos productos. Por ejemplo, en 2013 la cantidad aplicada en los campos del país aumentó en 317 millones de kg/L (Cesafe, 2013).

Los suelos destinados a barbecho suponen una parte importante del total, ya que esta práctica es muy frecuente. Desde el punto de vista agronómico, un suelo en barbecho se encuentra en un período de recuperación o acumulación de componentes; de este modo, se produce el reciclado de los nutrientes y del agua, a través de un silencioso proceso. Para que esto ocurra, se mantiene el suelo libre de vegetación, cubierto sólo por los rastrojos de cultivos anteriores. Hasta hace 20 años, el método utilizado para controlar las malezas durante el barbecho era el laboreo mecánico del suelo, pero en gran parte de las áreas productivas la siembra directa ha reemplazado esta práctica por el uso de herbicidas pulverizados en pre o postemergencia, técnica denominada barbecho químico (Leiva, 2012; Massaro, 2010). En Argentina, el 78.5% de la superficie agrícola se encuentra bajo siembra directa (Aparicio, 2013).

En este contexto productivo es importante conocer los niveles de residuos de plaguicidas presentes en los suelos, con el fin de poder usarlos adecuadamente, garantizando un beneficio máximo y a su vez minimizando el riesgo para el medio ambiente (por ejemplo, contaminación de las aguas superficiales y/o subterráneas procedente de suelos contaminados por plaguicidas). Teniendo en cuenta la toxicidad relativamente elevada de algunos plaguicidas, es importante contar con metodologías analíticas sensibles y selectivas, capaces de determinar de manera fiable bajos niveles de residuos en este tipo de muestras (Andreu, 2004; Borjesson, 2000).

El suelo es una matriz compleja que suele presentar problemas en los análisis. Además, como pueden ser muy diferentes, tanto en su composición como en sus características físico-químicas, es común encontrar interferentes que varían notablemente de unos suelos a otros. Estos interferentes pueden ser extraídos junto a los analitos y co-eluir con ellos en la separación cromatográfica dificultando el análisis y ocasionando un importante ME en métodos LC-MS. De este modo, la ionización de los analitos en la interfase puede verse afectada obteniéndose exaltaciones o supresiones de su señal analítica, conduciendo a errores importantes en su cuantificación en el caso de no corregir/minimizar adecuadamente este efecto indeseable (Niessen, 2006).

Otro problema muy común en el análisis de suelos es la fuerte adsorción de ciertos analitos sobre el mismo, con lo que el método de extracción aplicado debe ser eficiente para asegurar la extracción cuantitativa de estos compuestos. En compuestos apolares, como los históricos plaguicidas organoclorados, la mayoría ya en desuso, su fuerte adsorción hace que sean necesarios normalmente sistemas de extracción tipo soxhlet, mientras que para los compuestos menos polares, usados mayoritariamente en la actualidad, suele ser suficiente una extracción mediante agitación mecánica o ultrasonidos. A día de hoy, existen sistemas muy eficientes, como la extracción acelerada con disolventes (ASE) o la extracción asistida por microondas (MAE), que suelen asegurar la extracción cuantitativa del compuesto, independientemente de su polaridad, haciendo uso de los disolventes adecuados (Ahmadi, 2015; Albaseer, 2010; Fenoll, 2014; Net, 2015; Rezaee, 2010; Tadeo, 2012).

----- 0 -----

En el trabajo que se presenta a continuación se ha desarrollado un MRM rápido, sensible y de fácil implementación en otros laboratorios para la determinación de residuos de plaguicidas

en suelos. El trabajo surge como resultado de la colaboración con el INTA de Argentina. Para llevarlo a cabo se seleccionaron plaguicidas de amplio uso en la agricultura de este país (Minagricultura, 2014). El desarrollo, validación y aplicación del método se efectuó en varios suelos argentinos, con propiedades físico-químicas distintas, tomados en diferentes zonas en las que no se había practicado la agricultura en los últimos años. El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un método que pudiera ser implementado fácilmente al laboratorio del INTA (Balcarce), en el cual también se dispone de un equipo de LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. Las estructuras químicas de los compuestos estudiados se muestran en la **figura 2.5**.

Compuestos/Uso	Estructura	Compuestos/Uso	Estructura
Ametrina (AME) Herbicida		Diazinon (DZN) Insecticida	
Atrazina (ATR) Herbicida		Epoxiconazol (EPZ) Funguicida	
Carbaril (CBL) Insecticida		Fipronil (FPN) Insecticida	
Carbendazima (CAR) Funguicida		Imidacloprid (IMI) Insecticida	
Carbofuran (CRB) Insecticida		MCPA Herbicida	
Cianizina (CYN) Herbicida		Malation (MAL) Insecticida	
Clorpirifos (CHLOR) Insecticida		Metalaclor (MEC) Herbicida	
2,4 D (2,4D) Herbicida		Pendimetalin (PEN) Herbicida	
Dimetoato (DIM) Insecticida		Picloran (PIC) Herbicida	

Figura 2.5. Estructura química y nomenclatura de los compuestos objeto de estudio

Durante la optimización de la metodología, se compararon dos sistemas de extracción. El primero se basó en una extracción convencional solido-líquido (SLE), ensayando distintos disolventes (ACT, MeOH y ACN) y aplicando agitación mecánica seguida de ultrasonidos. El segundo se fundamentó en el sistema QuEChERS, usado también en análisis de residuos de plaguicidas en suelos como una buena alternativa a la extracción tradicional con disolventes (Arias, 2014; Bruzzoniti, 2014; Cheng, 2014; De Carlo, 2014; Lesueur, 2008; Masiá, 2015). Los análisis, como en el resto de trabajos de esta Tesis, se llevaron a cabo mediante LC-MS/MS QqQ.

En lo referente a la validación del método se tuvieron en cuenta los criterios de la Decisión 657/2002/EC de la Comisión Europea, y especialmente la guía SANCO sobre análisis de residuos de plaguicidas en alimentos, suelos y aguas (SANCO/12571/2013). Ambas guías establecen que para identificar correctamente un compuesto en la muestra analizada se deben adquirir al menos dos transiciones por analito en modo tándem MS. Además, la relación de intensidades entre ambas transiciones (ion ratio, q/Q) debe ser semejante a la obtenida para el patrón, con una tolerancia máxima determinada (entre 20 y 50% en la Decisión 657/2002/EC; $\leq 30\%$ en la guía SANCO). El tiempo de retención debe ser también análogo, con una desviación máxima previamente establecida ($\pm 2.5\%$ en la Decisión 657/2002/EC; ± 0.2 min en la guía SANCO).

2.2.2. Artículo científico 3

Simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography - tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina

Eduardo De Gerónimo*, Ana María Botero-Coy, José M. Marín, Virginia C. Aparicio, José L. Costa, Juan V. Sancho, Félix Hernández.

Analytical
Methods



PAPER



Cite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 9504

A simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina†

Eduardo de Gerónimo,^{*a} Ana María Botero-Coy,^b José M. Marín,^b Virginia C. Aparicio,^a José L. Costa,^a Juan V. Sancho^b and Félix Hernández^{*ab}

A rapid analytical methodology has been developed for multi-residue determination of pesticides in soils using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with a triple quadrupole analyzer. Soil samples were collected from 12 representative agricultural areas in Argentina, and 18 pesticides were selected on the basis of their use. Special attention was paid to minimize sample preparation, making easier the method application to routine analysis. Several extraction procedures were tested, performing a careful study on matrix effects. The method finally proposed (extraction with acetonitrile and a subsequent 2-fold dilution with water without any clean-up step) was fully validated at 0.05 and 0.5 mg kg⁻¹ on the basis of European SANCO 12571/2013 and 825/00 guidelines. The method applicability and robustness were demonstrated by analysis of quality control (QC) samples, consisting of eleven soils spiked at 0.5 mg kg⁻¹. These soil samples were collected from different experimental plots, and were very diverse in their physico-chemical characteristics. The methodology developed is of easy application, there is low consumption of solvents and reagents, and no clean-up is required despite the complexity of the soil matrix. In the near future, the method developed will be used to monitor the presence of pesticides in large agricultural areas of Argentina.

Received 22nd June 2015
Accepted 30th September 2015
DOI: 10.1039/c5ay01582k
www.rsc.org/methods

1. Introduction

Argentina is ranked the tenth agricultural nation in the world considering the area under cultivation, based on figures produced by the Food and Agricultural Organization of the United Nations.¹ With 31 million hectares given over to agriculture, Argentina accounts for 2.2% of the world's total area under cultivation.² The Argentine agrochemical market has strongly expanded over recent years, with an increase in the consumption from 73 to 236 million kg per year over the last 10 years. This represents a total turnover of US\$ 2381.16 million in 2012, with the following distribution: 64% herbicides, 16% insecticides, and 20% fungicides, acaricides and seed cure.³

Transgenic crops account for three quarters of Argentina's total cultivated land. In addition, 78.5% of the agricultural lands are under direct seeding,⁴ where the only way of

controlling weeds, during cultivation and fallow periods, is by using agrochemicals.

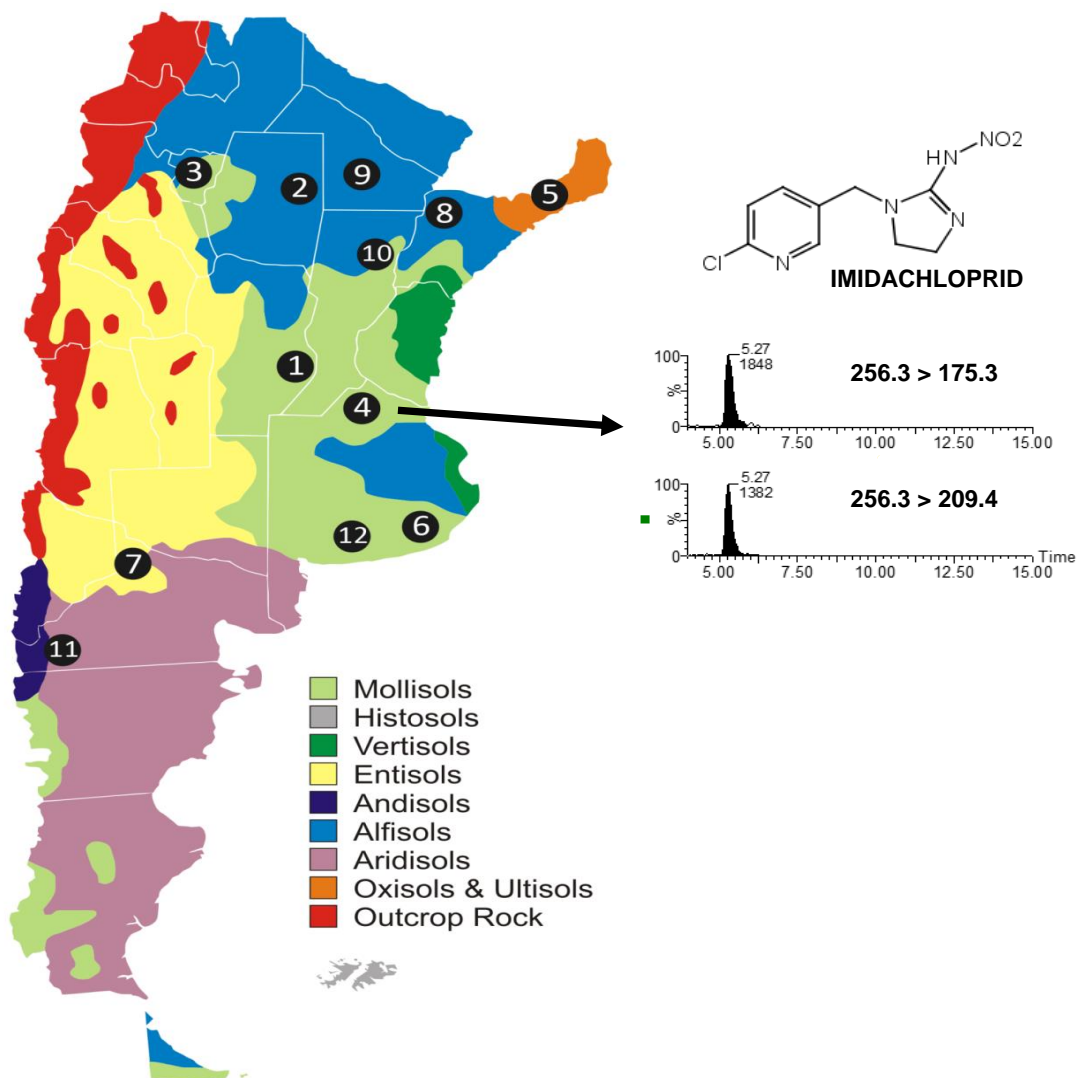
Nowadays, the analysis of pesticide residues in environmental waters and soils has become indispensable in agricultural areas. Information provided by both, soil and water, is required to have a realistic knowledge on the impact of agricultural activities on the environment. Soil is a complex matrix sample, where the presence of many different co-extracted components negatively affects pesticide residue determination. Particularly, soil organic matter has a notable impact on analyses and therefore it is common for the inclusion of clean-up steps in the analytical procedure for its removal, even by using powerful analytical techniques such as liquid chromatography (LC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS).⁵⁻⁷

Many different techniques have been used along the time for soil sample preparation, including extraction and/or clean-up, such as Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction (PLE), ultrasound-assisted extraction (UAE), dispersive liquid-liquid microextraction, microwave-assisted extraction, liquid-liquid extraction, accelerated solvent extraction, solid-phase extraction (SPE), or solid-phase microextraction.⁸⁻¹¹ However, the classical solid-liquid extraction with organic solvents, commonly followed by appropriate clean-up procedures, has been one of the

^aInstituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Route 226 Km 73,5 (7620), Balcarce, Buenos Aires, Argentina. E-mail: degeronino.eduardo@inta.gov.ar; Tel: +54 2266 43900

^bResearch Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain. E-mail: felix.hernandez@uji.es; Tel: +34 964 387366

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ay01582k



Simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography - tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina.

Anal. Methods, 7 (2015) 9504- 9512

Eduardo De Gerónimo^{1*}, Ana María Botero-Coy², José M. Marín², Virginia C. Aparicio¹, José L. Costa¹, Juan V. Sancho², Félix Hernández^{*2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Route 226 Km 73,5 (7620), Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

² Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellon, Spain*
Correspondence:

ABSTRACT

A Rapid analytical methodology has been developed for multi-residue determination of pesticides in soils using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with triple quadrupole analyzer. Soil samples were collected from Argentina in 12 representative agricultural areas, and 18 pesticides were selected on the basis of their use. Special attention was paid to minimize sample preparation, making easier the method application to routine analysis. Several extraction procedures were tested, performing a careful study on matrix effects. The method finally proposed (extraction with acetonitrile and subsequent 2-fold dilution with water without any clean-up step) was fully validated at 0.05 and 0.5 mg/kg on the basis on European SANCO 12571/2013 and 825/00 guidelines. The method applicability and robustness was demonstrated by analysis of quality control (QC) samples, consisting on eleven soils spiked at 0.5 mg/kg. These soil samples were collected from different experimental plots, and were very diverse in their physico-chemical characteristics. The methodology developed is of easy application, there is low consumption of solvents and reagents, and no clean-up is required despite the complexity of the soil matrix. In the near future, the method developed will be used to monitor the presence of pesticides in large agricultural areas of Argentina.

Keywords: Pesticide residue analysis; soil; QuEChERS; LC-MS/MS triple quadrupole; matrix effects

INTRODUCTION

Argentina is ranked the tenth agricultural nation in the world considering the area under cultivation, based on figures produced by the Food and Agricultural Organization of the United Nations ¹. With 31 million hectares given over to agriculture, Argentina accounts for 2.2% of the world's total area under cultivation ². The Argentine agrochemical market has strongly expanded over recent years, with an increase in the consumption from 73 to 236 million kg per year over the last 10 years. This represents a total turnover of US\$ 2381.16 million in 2012, with the following distribution: 64% herbicides, 16% insecticides, and 20% fungicides, acaricides and seeds cure ³.

Transgenic crops account for three quarters of the Argentina's total cultivated land. In addition, 78.5% of agricultural lands are direct seeding ⁴, where the only way of controlling weeds, during cultivation and fallow periods, is by using agrochemicals.

Nowadays, the analysis of pesticide residues in environmental waters and soils has become indispensable in agricultural areas. Information provided by both, soil and water, is required to have a realistic knowledge on the impact of agricultural activities on the environment. Soil is a complex-matrix sample, where the presence of many different co-extracted components negatively affects pesticides residue determinations. Particularly, soil organic matter has notable impact on analyses and therefore it is common the inclusion of clean-up steps in the analytical procedure for its removal, even using powerful analytical techniques such as liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) ⁵⁻⁷.

Many different techniques have been used along the time for soil sample preparation, including extraction and/or clean-up, such as Soxhlet extraction, pressurized-liquid extraction (PLE), ultrasound-assisted extraction (UAE), dispersive liquid-liquid microextraction, microwave assisted extraction, liquid-liquid extraction, accelerated solvent extraction, solid-phase extraction (SPE), or solid-phase microextraction ⁸⁻¹¹. However, the classical solid-liquid extraction with organic solvents, commonly followed by appropriate

clean-up procedures, has been one of the most widely used in pesticide residue analysis (PRA) in soils, employing mechanical agitation and/or ultrasounds ^{12,13}.

The increasing need to reduce solvent amounts and manual labor in analytical laboratories has led to the commercial introduction of alternative extraction approaches. Among these, the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) procedure is one of the most popular ¹⁴. Originally developed for fruits and vegetables, QuEChERS is being applied to many other matrices, including soil samples ^{15–17}. The original procedure consisted on extraction with acetonitrile, separation of water by addition of anhydrous MgSO₄ and NaCl, and subsequent clean-up using dispersive solid-phase extraction (d-SPE) ¹⁴. Some modifications have been included in the QuEChERS procedure due to the possible negative influence on the recovery arising from the retention properties of the soil matrix. Thus, UAE, PLE ^{18–20}, as well as modifications in the clean-up step ^{21–23} have been applied to deal with the matrix interferences commonly found in soil analysis.

In relation to the analytical techniques applied for PRA in soil, there has been a clear evolution along the time from the first analysis, commonly performed by GC-MS and/or LC-UV, to the most recent ones, based on GC-MS/MS and/or LC-MS/MS, which nowadays are the techniques of choice in this field ^{19,24–28}. The wide majority of pesticides currently applied are of medium-high polarity and of low volatility; therefore LC-MS/MS is the preferred technique for most of them ²⁹. Despite the excellent characteristics of this technique (robustness, and high sensitivity and selectivity), matrix effects are commonly a problem in LC-MS/MS methods and may notably affect the ionization of the analytes leading to important analytical errors if not satisfactorily corrected. This is an important issue in soil analysis, as the matrix sample can largely vary from one soil to the other, making matrix effects correction or minimization troublesome.

The goal of this study was to develop a rapid and simple LC-MS/MS multiresidue method for the determination of pesticides in soils commonly found in Argentina. We pursued the minimization of sample manipulation and solvent consumption (i.e. extract the sample and directly inject into the LC-MS/MS) in order to make the method easier to apply and to implement in Argentinian laboratories. To this aim, soil extraction with different organic solvents was tested and the results compared with the QuEChERS in order to select the most appropriate in terms of extraction efficiency, less matrix effects, minimum sample treatment

and better robustness. The method developed was validated and evaluated for several soil samples collected from different agricultural areas of Argentina.

EXPERIMENTAL

Reagents and chemicals

Pesticide reference standards were from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade methanol (MeOH), HPLC-grade acetonitrile (ACN), and acetone for residue analysis from Scharlab (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Formic acid (HCOOH, content >98%) and ammonium acetate (NH₄Ac, reagent grade) were supplied by Scharlab.

QuEChERS (CEN) standard method EN 15622 reagents were purchased from Scharlab.

Stock standard solutions were prepared dissolving 50 mg powder, accurately weighed, in 100 mL of acetone, obtaining a final concentration around 500 mg/L. For LC-MS analysis, the stock solutions were ten-fold diluted with ACN to prepare individual solutions around 50 mg/L. From these, mixed solutions were prepared by diluting with ACN to obtain a final concentration of 5 mg/L. Working mix solutions of all pesticides were prepared from the 5 mg/L solutions by dilution with ACN.

In order to remove solid particles, nylon syringe filters (0.22 µm) were tested (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Sampling area

Samples were collected from 12 experimental fields of Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (**Figure 1 SI**), where no agricultural activity took place in the last years. En each sampling plot, a composite sample from 50 sub-samples (from 0 to 5 cm depth) was prepared.

The probe was cleaned by discarding several extractions in order to avoid any contamination between samples. The samples were conditioned using a hot-air heater set at 30 °C, and then dry milled. The mill was used only for untreated samples in order to avoid contamination, and it was cleaned between samples by washing with abundant water. The dried samples were then passed through a 2 mm sieve.

In the INTA laboratory at Balcarce, soil texture of all the samples was determined, as well as cation-exchange capacity (CEC), pH and total organic carbon (**Table 1, Supplementary Information**).

Selected pesticides

Pesticides selected as target analytes were chosen among the most widely used in agricultural practices of Argentina.³⁰ In the list of the 30 most-consumed pesticides, the 3 top compounds are herbicides, specifically glyphosate, 2,4-D and atrazine. The second and third compounds were selected for this work, but unfortunately glyphosate could not be included in this multi-residue methodology due to its particular physico-chemical characteristics, which require the use of specific methodology for this compound.⁷ Other compounds from the list of most-consumed pesticides included in the present work were chlorpyrifos, picloram, metolachlor, imidachloprid and fipronil. Those pesticides from the top-list that were more appropriate for GC analysis were excluded from this study, and finally another eleven LC-MS amenable compounds, frequently used in agricultural practices around the world, were also included in the above list. In addition, another eleven LC-MS amenable compounds, frequently used in agriculture, were also considered making a total of 18 target pesticides including herbicides (8), fungicides (2) and insecticides/acaricides (8).

Liquid chromatography/mass spectrometry

A Waters Alliance 2795 LC system was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters Milford, MA, USA) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface. The LC separation was performed using a Brisa C18 column (3 μ m, 5 cm \times 2.1 mm; Teknokroma) at a flow rate of 0.2 mL/min. The mobile phase was water (0.1 mM NH₄Ac)/MeOH with a gradient where the percentage of MeOH changed as follows: 0 min, 20%; 1 min, 20%; 1.8 min, 35%; 6 min, 80%; 11 min 95%; 11.5 min 95%; 12 min to 15 min, 20%.

The drying gas as well as the nebulizing gas was nitrogen. The desolvation gas and cone gas flows were adjusted to 600 and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump, directly connected to the interface. For operation in MS/MS mode, the collision gas was argon (99.995%; Praxair, Valencia, Spain) at a pressure of 2×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3 kV in negative ionization mode and 3.5 kV in positive mode were used.

The interface temperature was set to 350 °C and the source temperature to 120 °C. In order to assure at least 10 points per chromatographic peak, compounds were distributed in different functions at dwell times of 0.1 s except for picloram (0.2 s). Two solvent delays were selected to give an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx v.4.1 software, the first one from 0 to 2.3 min and the second one from 12 to 15 min. The application manager TargetLynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

Recommended procedure

5.0 g of soil sample (previously dried at room temperature and homogenized) were weighted into a 50-mL centrifuge tube and extracted with 5 mL water and 25 mL ACN in a mechanical shaker for 1 h followed by ultrasonic bath for 15 min. Then, it was centrifuged at 4600 rpm for 10 min. A 500 μ L aliquot of the supernatant was diluted with 500 μ L HPLC-grade water into a glass tube. Then, 10 μ L formic acid was added to adjust its final content to 1%. After that, the extracts were filtered through a 0.22 μ m nylon membrane. Analyses were performed by injecting 20 μ L of the final extract in the LC-ESI-MS/MS system.

Calibration curves in solvent (between 1 and 100 ng/mL) were prepared by taking 440 μ L water, and adding 10 μ L HCOOH, 100 μ L of corresponding standard mix solutions and 400 μ L of acetonitrile. QCs were also analyzed in every set of samples for quality control in order to ensure the recoveries were within the tolerance range (60-140%) following SANCO guidelines.

Fortification of samples for recovery experiments (in both method validation and preparation of QCs) was performed by delivering 1 mL of 0.25 or 2.5 μ g/mL standard mix solutions in acetonitrile to 5 g homogenized soil sample in order to yield fortification levels of 0.05 or 0.5 mg/kg, respectively. The fortified samples were aged for 1 h prior extraction.

Method validation

In the absence of specific guidelines for soil analysis, validation of the method was made on the basis of the European Union SANCO 12571/2013 guideline for pesticide residues analysis in food and feed ³¹. In addition, the SANCO 825/00, Rev.1 guidance document on residue analytical methods was also taken into account ³². Linearity was studied by injecting (in triplicate) standards in solvent (ACN:water) and also in the soil extract used for method development at seven concentrations in the range 1– 100 ng/mL (equivalent to 0.012–1.2 mg/kg in sample). Precision (repeatability, % relative standard deviation) and accuracy (% recoveries) were estimated by recovery experiments in soil at two fortification levels, 0.05 and 0.5 mg/kg (analyzed in quintuplicate). The limit of quantification (LOQ) objective was set as the lowest concentration validated in fortified samples with satisfactory precision (RSD<20%) and recovery (70 -120%).

The specificity of the method was evaluated from the quantification transition by analysis of a procedure blank, a processed blank sample, and a processed blank sample spiked at the LOQ level.

Confirmation of the identity of the compound in the samples was carried out by acquisition of two MS/MS transitions and the compliance of the q/Q ratio (where q, Q are the confirmation and quantification transitions, respectively) between samples and reference standards, with maximum tolerance of \pm 30%. The agreement in retention time was also required, with maximum deviation of \pm 0.2 min between the analyte in sample and the reference standard³¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Soil samples selected in this work presented wide range of organic matter content (between 0.5 and 10.3%), clay (between 6.4 and 69.5%), CEC (between 9 and 40.5 cmol kg⁻¹), and pH (from 5.7 to 7.5) (see Table S1, S I). Therefore, the analytical methodology was tested in very different soil types, with a notable variation in their physico-chemical characteristics. This allowed us to support the robustness of the method and its applicability to a large variety of soil matrices.

MS optimization

MS/MS parameters were optimized by infusion of 2.5 mg/L methanol: water (50:50, v/v) individual solutions of each compound, at a flow rate of 10 µL/min. Full-scan mass spectra were acquired to select the precursor ion and optimum cone voltage. Once the precursor ion was selected, product ion scan acquisitions were performed at different collision energies in order to select product ions and optimum collision energies.

The majority of the analytes were determined by positive ionization mode, with a few exceptions for acidic compounds that gave a better response in negative mode (2,4-D, MCPA and fipronil). The formation of sodium adducts (cyanazine, dimethoate, metolachlor, carbaryl) was minimized adding 5mM of NH₄Ac in the vial, increasing in this way the abundance of the protonated molecule. Under the experimental conditions finally selected, all precursor ions corresponded to [M+H]⁺ in positive ESI, or [M-H]⁻ in negative ESI.

Two transitions were selected for each compound for analysis under selected reaction monitoring (SRM) mode. The most sensitive (Q) was used for quantification purposes, while the second transition (q) was used for confirmation of the identity, avoiding those transitions corresponding to non-specific losses such as H₂O and CO₂.

The presence of atoms with abundant characteristic isotope distribution (e.g., Cl) in the chemical structure was used to improve the identification process of some analytes by selecting the transitions corresponding to both ³⁵Cl and ³⁷Cl. This occurred for picloram and cyanazine (measured in ESI+) and for 2,4-D and MCPA (negative mode) (Figure 2SI).

The mass spectrometry parameters selected, i.e. precursor and product ions, cone voltage and collision cell energy, together with the q/Q intensity ratio (a relevant parameter in the confirmation process) are shown in **Table 1**.

Chromatographic conditions

Two organic solvents (ACN and MeOH) as well as two modifiers (HCOOH and NH₄Ac) were tested to optimize the chromatographic separation and mass spectrometry signal (increase of sensitivity and satisfactory peak shape). The study was made with mix standard solutions (100 µg L⁻¹ each compound) in solvent. Under the final conditions selected, matrix-matched standards at 100 µg L⁻¹ were also injected to test for possible variations in retention time and peak shape.

As expected, most of compounds determined in positive mode presented better ionization yield when MeOH was used as organic modifier due to its protic character. On the contrary, for those compounds determined under negative ionization, the use of an aprotic solvent in the mobile phase, as acetonitrile, favored their ionization. In order to improve their chromatographic retention, the acidification of the mobile phase, by adding low amounts of HCOOH, was necessary. Therefore, the use of acetonitrile with an acidic additive seemed a good option for compounds ionized in negative mode trying to reach a compromise between chromatographic retention and ionization.

The effect of adding NH₄Ac as modifier was also evaluated, with the result that sensitivity and peak shape improved for most compounds when a small amount (0.1 mM) was present in the aqueous phase. The addition of NH₄Ac in the organic solvent did not produce a significant improvement; therefore, NH₄Ac was added only to the aqueous phase. As the majority of analytes (15 out of 18) were determined in positive ionization mode, we finally selected methanol as organic solvent in the mobile phase and NH₄Ac as modifier in the aqueous phase.

Table 1. Mass spectrometric conditions for selected compounds.

No	Compound	Use	Mode	RT (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Cone (V)	Collision energy (eV)	Product ion (<i>m/z</i>) ^a	q/Q (RSD)
1	Picloram (PIC)	Herbicide	ES+	3.1	241.2 243.2	25	20 20	195.2 197.2	0.94(0.02)
2	Imidacloprid (IMI)	Insecticide	ES+	5.3	256.3	25	15 15	175.3 209.4	0.87(0.03)
3	Dimethoate (DIM)	Insecticide	ES+	5.7	230.3	15	10 20	199.2 143.1	0.45(0.03)
4	2,4-D	Herbicide	ES-	6.3	219.3 221.3	20	15 15	161.2 163.2	0.84(0.04)
5	MCPA	Herbicide	ES-	6.4	199.3 201.3	20	15 15	141.2 143.2	0.28(0.03)
6	Carbendazim (CAR)	Fungicide	ES+	6.5	192.3	25	15 30	160.2 132.2	0.18(0.01)
7	Cyanazine (CYN)	Herbicide	ES+	7.3	241.4 243.4	30	15 15	214.3 216.3	0.32(0.01)
8	Carbofuran (CRB)	Insecticide	ES+	7.4	222.4	25	20 10	123.2 165.2	0.71(0.04)
9	Carbaryl (CBL)	Insecticide	ES+	7.9	202.4	15	10 25	145.1 117.2	0.16(0.01)
10	Atrazine (ATZ)	Herbicide	ES+	8.3	216.4	35	15 30	174.3 104.2	0.24(0.01)
11	Ametryn (AME)	Herbicide	ES+	9.0	228.4	35	20 25	186.4 96.3	0.35(0.01)
12	Malathion (MAL)	Insecticide	ES+	9.2	331.3	20	10 25	127.1 99.1	0.67(0.10)
13	Metolachlor (MEC)	Herbicide	ES+	9.7	284.4	20	15 25	252.4 176.3	0.48(0.01)
14	Epoxiconazole (EPZ)	Fungicide	ES+	9.8	330.3	30	20 20	121.1 162.2	0.12(0.05)
15	Fipronil (FPN)	Insecticide	ES-	9.9	435	20	15 25	330.0 250.2	0.28(0.03)
16	Diazinon (DZN)	Insecticide	ES+	10.2	305.3	30	20 20	169.2 153.2	0.77(0.12)
17	Chlorpyrifos (CHLOR)	Insecticide	ES+	11.9	350.1	25	20 20	198.2 115.1	0.36(0.02)
18	Pendimethalin (PEN)	Herbicide	ES+	12.0	282.4	15	10 20	212.4 194.3	0.12(0.01)
	<i>Dimethoate-d6</i>		ES+	5.7	236.3	15	10 15	205.2 131.1	0.51(0.03)
	<i>MCPA-d3</i>		ES-	6.4	202.3 204.3	20	15 15	144.2 146.2	0.30(0.06)
	<i>Chlorpyrifos-d10</i>		ES+	11.8	360.1	25	20 20	199.2 115.1	0.09(0.01)

^a The first transition (top) was used for quantification and the second transition (bottom) was used for confirmation.

In order to obtain better retention for the most polar compounds, 10% of methanol was tested as initial percentage. However, an excessive band broadening was observed for some compounds. This situation was improved by increasing the initial content of methanol. Starting the gradient at 20% of MeOH led to satisfactory retention and peak shape for nearly all analytes. Nevertheless, under these conditions acidic analytes like MCPA, fipronil or 2,4-D, showed lower sensitivity and poor chromatographic retention. HCOOH (0.01 and 0.1 %) was tested in both water and MeOH phases in order to increase their retention, but it was discarded because sensitivity decreased and worse peak shapes were obtained. Therefore, the addition of 0.5 or 1% (v/v) HCOOH in the sample vial was tried, avoiding in this way the continuous entrance of this additive into the ionization source. Using 1% HCOOH in the sample vial provided better peak shape and acceptable reproducibility, increasing significantly the sensitivity in negative mode.

The chromatographic conditions finally selected are indicated in “Experimental” section. Under these conditions, the compounds eluted as shown in **Table 1**, with retention times between 3.1 min (picloram) and 12 min (pendimethalin).

The two SRM transitions per compound were distributed in eleven functions according to the retention times in order to achieve adequate number of points per chromatographic peak.

Matrix effects evaluation

A detailed study of matrix effects was made by comparison of standards in solvent and in soil matrix at the same concentration after application of different sample treatments. Firstly, three extracting solvents were studied (MeOH, ACN and acetone), following the recommended procedure (see section 2.5). For each solvent, the effect of 2-, 5- and 10-fold dilution with water of the initial soil extract was assayed in order to reduce potential matrix effects.

To evaluate matrix effects (%ME), the response/signal obtained for each analyte in the soil extract (S_{matrix}) was compared with that in solvent (S_{solvent}) at the same concentration. To perform this study, soil extracts spiked at 50 ng/mL ($n=3$) were used. The ratio $[(S_{\text{matrix}} - S_{\text{blank}})/S_{\text{solvent}}] \times 100$ was taken as absolute matrix effect, where S_{blank} corresponded to the analyte signal of the non-spiked extract of soil. Thus, ME 100% means that no matrix effect was observed. Values below or above 100% indicate ionization suppression or enhancement,

respectively. No significant matrix effects were considered to be present when ME ranged between 70% and 120% (i.e. the same range used as acceptable recoveries in method validation).

A summary of the results can be found in **Supplementary Information**. Both ionization suppression and enhancement were observed although most analytes were influenced by suppression. Acetone was found to be less suitable for extraction in terms of matrix effects, surely due to the larger amount of co-extractive compounds in this solvent. The use of MeOH and ACN led in general to lower matrix effects for most of compounds selected. As expected, the effect of diluting the extracts with water resulted in a minimization of matrix effects, in such a way that a dilution $\times 10$ led to satisfactory values (between 70 and 120%) for almost all compounds (**Figure 3 SI**). We finally selected a 2-fold dilution as a compromise between minimization of matrix effects and sensitivity required to reach the limit of quantification objective in this work (0.05 mg/kg).

A comparison of the matrix effects observed with the three extracting solvents after 2-fold dilution of the soil extract with water is shown in **Figure 4 SI**.

Moreover, a slight modification of QuEChERS (CEN) standard method EN 15622 (extraction of 5 g soil sample with water (5 mL) and acetonitrile (10 mL), followed by a salting-out with 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl, 1 g sodium citrate dihydrate and 0.5 g di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate) was tested. In order to minimize matrix effects observed, 2-fold dilution (final analyte concentration 50 $\mu\text{g/L}$), 4-fold dilution (20 $\mu\text{g/L}$) and 5-fold dilution (10 $\mu\text{g/L}$) were checked (**Figure 5 SI**). Matrix effects were irrelevant (between 70-120%) at dilution $\times 5$, except for 2,4D and MCPA that presented signal enhancement. As expected, matrix effects become more important in more concentrated extracts (i.e. 2-fold dilution), where signal suppression was mostly observed for analytes measured in positive ionization whereas a notable signal enhancement occurred for those determined in negative mode (MCPA, 2,4D and Fipronil). Moreover, different clean-up reagents, as octadecyl-silanized silica gel (C18), Florisil, graphitized carbon black (GCB), and $\text{MgSO}_4/\text{C18}$ and $\text{MgSO}_4/\text{C18}/\text{GCB}$ mixtures, were evaluated in the QuEChERS procedure. After the clean-up step, a 2-fold extract dilution was carried out without any improvement of the results obtained. The commonly applied dispersive-SPE step with primary-secondary amine (PSA) was not tested in this work due to the low recoveries reported for acidic compounds when using PSA for clean-up ³³. The

retention of acidic analytes, as picloram, 2,4-D, fipronil or imazapic, on PSA material has been reported as the main reason of the low recoveries^{15,17,34,35}. In this work, the results after application of different clean-up procedures did not substantially improve. It seemed that the highly concentrated soil extract (1:2) employed, led to strong matrix effects in all cases for this type of matrices.

After all experiments performed, the extracting system finally selected was acetonitrile with two-fold dilution of the soil extract with water. Using this procedure, signal enhancement or signal suppression was not much significant for most compounds (ME for the soil tested varied between 60-120% for the analytes under study).

Nowadays, the use of isotope-labelled internal standards (ILIS) is widely accepted as an efficient and simple way to correct matrix effects. However, in multi-residue methods the use of ILIS is problematic due to the high cost and the unavailability of commercial ILIS for all analytes. Although only three ILIS were available at our laboratory (dimethoate-d6, MCPA-d3, chlorpyrifos-d10), we compared the results for the corresponding analytes (dimethoate, MCPA, chlorpyrifos) using calibration in solvent, with and without ILIS correction. MCPA showed recoveries at the LOQ level above 120% without applying correction. However, the use of its deuterated internal standard allowed correcting its recovery (working with relative areas), highlighting the relevance of using ILIS for each compound for an efficient matrix effects correction. The other two ILIS tested (dimethoate-d6, chlorpyrifos-d10) seemed unnecessary as the recoveries for dimethoate and chlorpyrifos were satisfactory without ILIS correction (**Table 2**). Therefore, the use of MCPA-d3 as ILIS is recommend, if available to the laboratory.

Due to the lack of ILIS availability in our laboratory for every analyte included in the method, we applied an alternative approach to assure correct quantification. It consisted on the analysis of all soil samples with and without fortification at 0.5 mg/kg. This implies that a quality control (QC) was analyzed for every soil. Therefore, a correction factor for quantification might be applied depending on the QC recovery in those cases that it was out of the tolerance window (see Analysis of Soil Samples section).

Table 2. Method validation*. Percentage recoveries and relative standard deviation (in brackets). Limits of detection of the method (LOD)

Compound	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	LOD (µg/kg)
Picloram (PIC)	50 (2)	51 (4)	3.9
Imidacloprid (IMI)	96 (3)	102 (5)	0.8
Dimethoate (DIM)	95 (6)	107 (6)	0.1
2,4 D (2,4D)	120 (10)	100 (6)	1.0
MCPA (MCPA)	134 (7)**	115 (11)**	0.9
Carbendazim (CAR)	90 (4)	94 (5)	3.0
Cyanazine (CZN)	74 (4)	85 (4)	0.1
Carbofuran (CRB)	98 (5)	93 (9)	0.1
Carbaryl (CBL)	138 (3)	107 (5)	0.1
Atrazine (ATZ)	86 (6)	91 (4)	0.1
Ametryn (AME)	100 (6)	100 (6)	0.2
Malathion (MAL)	99 (6)	99 (5)	0.1
Metolachlor (MEL)	101 (5)	99 (7)	0.2
Epoxiconazole (EPZ)	78 (3)	84 (6)	0.2
Fipronil (FPN)	114 (5)	112 (4)	0.3
Diazinon (DZN)	86 (8)	78 (7)	0.4
Chlorpyrifos (CHLOR)	91 (6)	91 (5)	0.3
Pendimethalin (PEN)	83 (5)	86 (8)	0.6

* Data corresponding to a soil sample collected from Balcarce

** Recoveries were 95% (0.05 mg/kg) and 102% (0.5 mg/kg) when MCPA-d3 was used as ILIS

Method validation

Linearity was satisfactory in the range 1– 100 ng/mL, in both solvent and in matrix-extract resulting after application of the recommended procedure. Correlation coefficients were higher than 0.99 and residuals lower than $\pm 30\%$ for all pesticides.

The method was validated using a soil sample that was spiked at two concentrations (analysis in quintuplicate). An estimation of matrix effects for this soil was made previously to method validation because it was different to the soil used in matrix effects evaluation section. The data obtained revealed a rather similar behavior, except for the three compounds measured in negative mode (**Figure 1**).

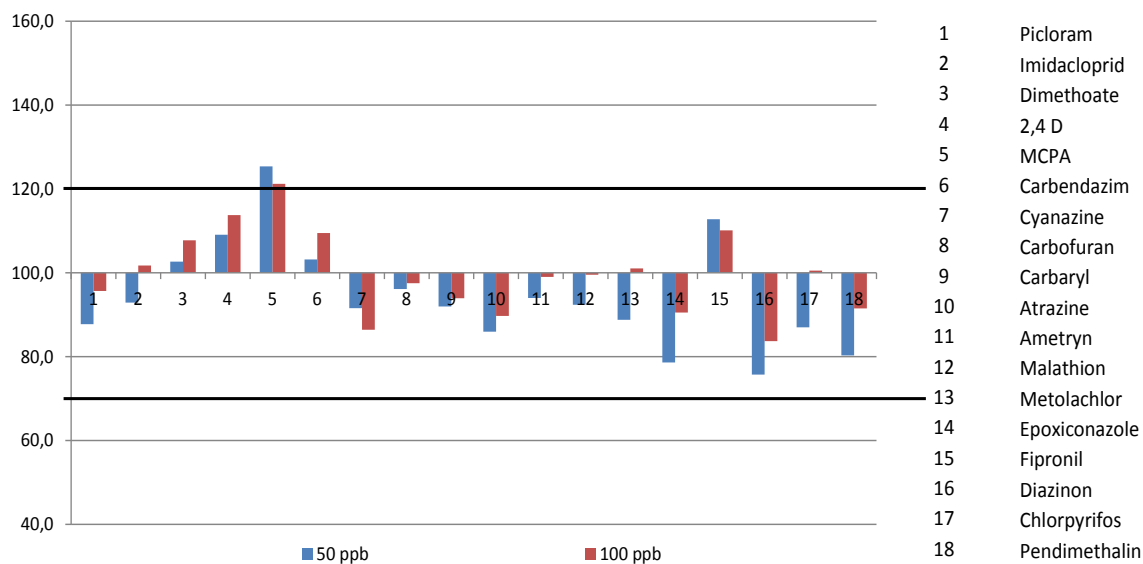


Figure 1. Matrix effects in the soil used for method validation after application of the recommended analytical procedure

The results for precision and accuracy at the two concentrations tested (0.05 and 0.5 mg/kg) are shown in **Table 2**. Data were obtained performing quantification with standards in solvent (ACN:water). The method presented satisfactory precision (RSD<20%) and accuracy (recoveries between 70 and 120%) for all analytes, at the two levels of fortification, with the exception of the herbicide picloram, whose recoveries were around 50%. Some authors also reported low recoveries for this weak acid herbicide when extracted from soils at pH lower than 7.⁶ The QC samples for picloram in the soils tested had average recoveries between 47 and 60%, which was consistent with data obtained in method validation. Although not tested in this work, the use of picloram ILIS, added as surrogate, seems the easiest and best solution to correct the analytical errors for this herbicide.

The LOQ objective was established to be 0.05 mg/kg, as this was the lowest analyte spiked level in samples that was fully validated with satisfactory precision and accuracy³¹. This value of 0.05 mg/kg is typically fixed as LOQ for pesticide residue methods in soil³². In order to illustrate the capability of the method to detect low analyte concentrations, the limit of detection (LOD) was estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the lowest point of the calibration prepared with standards in soil matrix (equivalent to 0.012 mg/kg) (be aware that the term LOD in this case is not used as limit of determination, as in certain guidances³²). The estimated LODs varied between 0.1 and 4 µg/kg (Table 2). The method was found specific as no relevant signals were observed in the blank extracts analyzed at the analyte retention time (see Figure 2 as an example for selected compounds).

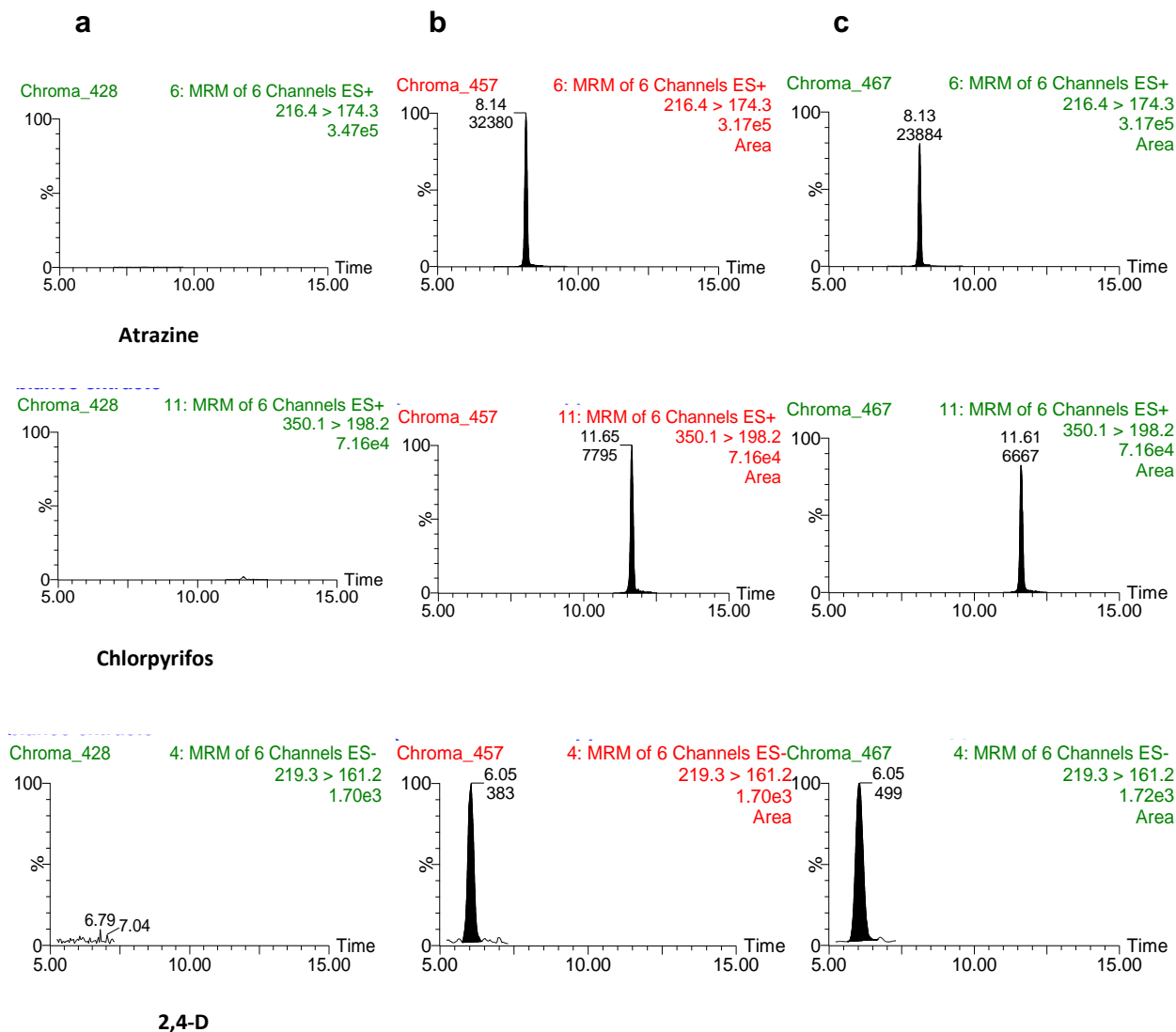


Figure 2 LC-MS/MS chromatograms for selected compounds: (a) blank soil (b) standard 50 µg/L, (c) Soil extract spiked at 50 µg/L.

Analysis of soil samples

Soils may strongly differ in their physico-chemical characteristics, which mean that a method satisfactorily validated for one soil sample only may be questionable for other soils. Therefore, with this type of matrices is important to ensure the robustness of the method and that data are satisfactory for different types of soils. This implies testing the method in a notable number of soil samples. Keeping this objective in mind, after method validation in the soil selected the methodology developed was assayed in eleven soil samples from different physico-chemical characteristics analyzing each soil before and after fortification (at 0.5 mg/kg) with the pesticides mixture, i.e. preparing individual QCs for each soil. Recoveries of the 11 individual QC samples served as an additional validation and supported the robustness and applicability of the method.

Soil samples used in this work (**Figure 1SI**) were considered as “blank” samples as no pesticides were expected to be found. Besides the eleven QCs analyzed additional QCs were prepared with the same soil used in validation experiments at 0.05 and 0.5 mg/kg fortification levels (in triplicate).

The results are shown in **Table 3**. As it can be seen, recoveries for the eleven QCs were highly satisfactory, leading to average values between 70-120%, with the only exception of picloram (60%). RSDs were excellent taking into account that all were individual values from different soils. Similarly, the QCs prepared from the soil used in the validation experiments (in triplicate) were in general satisfactory, with values from 60-120% for nearly all compounds at the LOQ and 10xLOQ level (i.e. 0.05 and 0.5 mg/kg). Again, picloram showed low recoveries (47%) at both concentrations. Recoveries for MCPA and carbaryl were satisfactory at 0.5 mg/kg, but they were higher than 120% at the LOQ level. This behavior was consistent with data obtained in method validation.

Despite that soil samples were collected from experimental fields without agricultural activities for several years, up to five pesticides were detected in 8 out of 11 soils analyzed: ametryn, atrazine, chlorpyrifos, dimethoate, imidacloprid (**See S.I. Table 2**). The herbicide atrazine was the most detected (4 soil samples). Ametrine, dimethoate, imidacloprid and chlorpyrifos were detected in two soil samples each. However, pesticide concentrations were mostly below the LOQ objective (0.05 mg/kg), and did not exceed 0.1 mg/kg in any sample.

The presence of some pesticides in the soils at very low concentrations was not considered much significant, and might be due to some drift when applying pesticides in nearby areas.

Table 3. Recovery for Quality Controls prepared from different soil samples

COMPOUND	Analysis of eleven soil samples*		QC LOQ (n=3)**		QC 10xLOQ (n=3)**	
	QC Rec	RSD	QC Rec	RSD	QC Rec	RSD
Picloram	60	16	47	4.6	47	1.0
Imidacloprid	98	6.1	88	2.8	94	1.9
Dimethoate	103	4.4	92	8.3	95	1.6
2,4-D	105	7.7	117	7.9	102	1.3
MCPA	111	9.2	132	2.5	110	1.7
Carbendazim	104	8.4	92	1.6	93	2.7
Cyanazine	84	7.0	65	5.8	74	2.1
Carbofuran	99	7.2	92	9.3	92	0.2
Carbaryl	105	4.3	164	10	98	0.0
Atrazine	88	7.7	66	4.1	74	0.9
Ametryn	98	4.6	92	3.1	90	0.4
Malathion	107	7.5	96	7.3	105	0.8
Metolachlor	100	5.7	89	1.4	88	0.3
Epoxiconazole	88	8.1	65	7.5	71	0.1
Fipronil	110	13	113	1.2	103	0.7
Diazinon	76	13	63	6.9	63	6.0
Chlorpyrifos	91	5.8	79	6.0	79	1.0
Pendimethalin	86	6.7	72	4.3	70	0.1

* Average recovery and relative standard deviation for 11 QCs prepared from different soils (0.5 mg/kg fortification level).

**Average recovery and relative standard deviation for the QCs prepared from the soil used in validation experiments (n=3) at 0.05 mg/kg (LOQ) and 0.5 mg/kg (10xLOQ) fortification level.

Figure 3 shows selected LC-MS/MS chromatograms for Pergamino soil sample, where three pesticides were detected. The identity of the compounds in the sample was confirmed by retention time and ion ratio agreement in comparison with the reference standard. As it can be seen, q/Q ratio deviation in all positives was within the maximum tolerance of $\pm 30\%$ (SANCO/12571/2013).

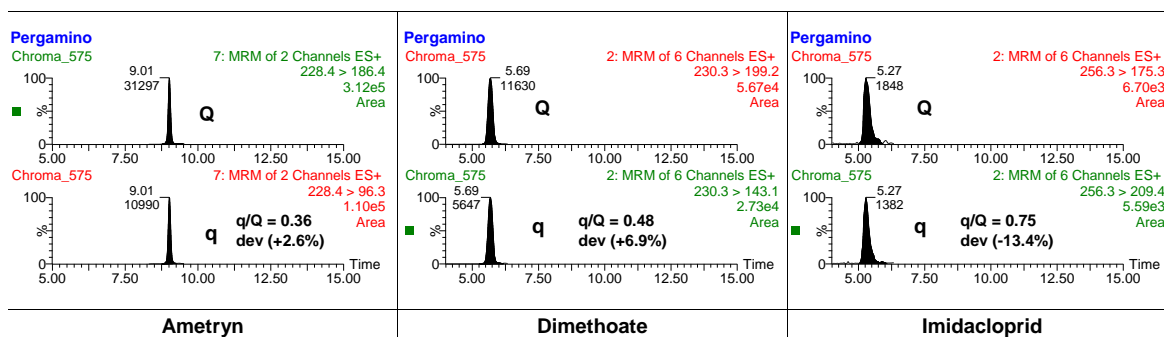


Figure 3. UHPLC-MS/MS chromatograms for Pergamino soil, where three pesticides were identified: ametryn (0.09 mg/kg), dimethoate (0.03 mg/kg*), imidacloprid (0.02 mg/kg*). Quantification transition (Q), confirmation transition (q) and *estimated concentration from a peak response above $S/N=10$ (but below the LOQ objective of 0.05 mg/kg).

CONCLUSIONS

A simple and fast LC-MS/MS multiresidue method has been developed for determination of pesticides of environmental concern in soil samples. After soil extraction with acetonitrile (1 hour mechanical shaking followed by 15 min ultrasounds) and two-fold dilution of the extract with water, satisfactory recoveries were obtained at 0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg, with LODs between 0.1 and 4 $\mu\text{g/kg}$. No clean-up steps were necessary, minimizing in this way sample manipulation, solvents and reagent consumption, and analysis time. The applicability of the method to very different types of soils from Argentina was demonstrated by analysis of QCs for each soil analyzed. Therefore, the analytical methodology proposed in this paper can be easily implemented to routine laboratories for monitoring pesticide residues in different types of soils.

Matrix effects were carefully studied and, with few exceptions, were not much relevant, allowing quantification of the compounds using standards in solvent. Despite the soils used in this study had not been employed for agricultural purposes for many years, two herbicides (atrazine, ametryn) and three insecticides (chlorpyrifos, imidachloprid, dimethoate) were detected at low concentrations (mostly below 0.07 mg/kg). This might be due to their use in the surrounding areas or as a result of uncontrolled runoff processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support of Generalitat Valenciana (Research Group of Excellence Prometeo 2009/054 and Prometeo II 2014/023; Collaborative Research on Environment and Food-Safety, ISIC/2012/016) is acknowledged. The authors would like to thank the staff at the agricultural sites for allowing them to use their facilities to carry out this study, and to INTA for providing the budget and the necessary infrastructure to obtain this data.

REFERENCES

- 1 Argenbio, 2012. "Gracias a los transgénicos, la Argentina ya está entre los primeros 10 países agrícolas." <http://argenbio.org/index/notas/5923> (accessed April 2015).
- 2 Osaro, 2015. <http://bcr.com.ar/default.aspx> (accessed April 2015).
- 3 Cesafe, 2013. <http://www.casafe.org/> (accessed April 2015).
- 4 V. C. Aparicio, E. De Gerónimo, D. Marino, J. Primost, P. Carriquiriborde and J. L. Costa, *Chemosphere*, 2013, 93, 1866–73.
- 5 V. Andreu and Y. Picó, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2004, 23, 772–789.
- 6 E. Assis, A. Silva, L. Barbosa, M. Queiroz, L. D'Antonino and V. GonCalves, *Planta Da*, 2011, 683–696.
- 7 A. M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J. V Sancho and F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 2013, 1292, 132–41.
- 8 S. S. Albaseer, R. Nageswara Rao, Y. V. Swamy and K. Mukkanti, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 5537–5554.
- 9 S. Net, A. Delmont, R. Sempéré, A. Paluselli and B. Ouddane, *Sci. Total Environ.*, 2015, 515-516, 162–180.
- 10 K. Ahmadi, Y. Abdollahzadeh, M. Asadollahzadeh and A. Hemmati, *Talanta*, 2015, 137, 167–173.
- 11 F. Hernández, J. Beltran, F. J. Lopez and J. V. Gaspar, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2313–2322.
- 12 M. R. Rigi, M. Farahbakhsh and K. Rezaei, *J. Brazil Chem Soc.*, 2015, 26, 156–164.
- 13 C. Tadeo, Jose., Perez, Rosa., Albero, Beatriz., Garcia-Valcácer, Ana., Sánchez-Brunete and A. L. N. van Nuijs, *J. AOAC Int.*, 2012, 14, 1258 – 1271.
- 14 M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher and F. J. Schenck, *J. AOAC Int.*, 2003, 86, 412–31.

- 15 J. L. D. O. Arias, C. Rombaldi, S. S. Caldas and E. G. Primel, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1360, 66–75.
- 16 M. C. Bruzzoniti, L. Checchini, R. M. De Carlo, S. Orlandini, L. Rivoira and M. Del Bubba, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406, 4089–116.
- 17 Y. Cheng, F. Dong, X. Liu, J. Xu, W. Meng, N. Liu, Z. Chen, Y. Tao and Y. Zheng, *Anal. Methods*, 2014, 6, 1788 – 1795.
- 18 N. Homazava, C. Gachet Aquillon, E. Vermeirssen and I. Werner, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2014, 94, 1085–1099.
- 19 N. Ivdra, S. Herrero-Martín and A. Fischer, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1355, 36–45.
- 20 A. Masiá, K. Vásquez, J. Campo and Y. Picó, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1378, 19–31.
- 21 S. S. Caldas, C. M. Bolzan, M. B. Cerqueira, D. Tomasini, E. B. Furlong, C. Fagundes and E. G. Primel, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 11918–11926.
- 22 T. Chai, Q. Jia, S. Yang and J. Qiu, *J. Sep. Sci.*, 2014, 37, 595–601.
- 23 S. Li, X. Liu, Y. Zhu, F. Dong, J. Xu, M. Li and Y. Zheng, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1358, 46–51.
- 24 V. C. Fernandes, S. J. Lehotay, L. Geis-Asteggianti, H. Kwon, H. G. Mol, H. van der Kamp, N. Mateus, V. F. Domingues and C. Delerue-Matos, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2014, 31, 262–270.
- 25 F. Hernández, M. Ibañez and T. Portolés, in *Comprehensive Environmental Mass Spectrometry*, ed. A. L. I. Publications, 2012, pp. 309 – 328.
- 26 F. Hernández, M. I. Cervera, T. Portolés, J. Beltrán and E. Pitarch, *Anal. Methods*, 2013, 5, 5875.
- 27 A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.-L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio and I. Leito, *Anal. Chim. Acta*, 2015, 870, 8–28.

- 28 P. Herrero, F. Borrull, E. Pocurull and R. M. Marcé, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2014, 62, 46–55.
- 29 H. V Botitsi, S. D. Garbis, A. Economou and D. F. Tsipi, *Mass Spectrom. Rev.*, 2011, 30, 907–39.
- 30 Minagricultura, Insumos agrícolas, http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/contratistas_rurales/index.php (accessed April 2015).
- 31 SANCO/12571/2013, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General
32. SANCO 825/00, rev. 8.1. 2010, Guidance document on pesticide residue analytical methods, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General
33. Acidic pesticides using QuEChERS method; <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/acidicpesticides.pdf> (accessed January 2015)
34. R. Romero-González, M.M. Aguilera-Luiz, P. Plaza-Bolaños, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, *J. Chromatogr. A.*, 2011, 1218, 9353–9365.
35. F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong, *J. AOAC Int.*, 2008, 91, 422–438.

Analytical Methods

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina

Eduardo De Gerónimo^{1*}, Ana María Botero-Coy², José M. Marín², Virginia C. Aparicio¹, José L. Costa¹, Juan V. Sancho², Félix Hernández^{*2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Route 226 Km 73,5 (7620), Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

² Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellon, Spain

S.I. Table 1. Physico-chemical properties of the model soils used in this study, collected from different areas of Argentina

Nº Lab.	EEA INTA	Nº	C.E.C. Cmol/kg (2)	Sand	Silt (%) (1)	Clay	(OM) (3)	pH (3)
66298	Marco Juarez	1	32.9	12.9	53.4	33.7	4.7	6.4
66279	Sgo del Estero	2	19.9	21.3	54.9	23.8	4.5	7.3
66282	Famaila	3	38.3	8.5	57.1	34.4	8.5	6.5
66283	Pergamino	4	16.5	19.9	53.5	26.6	2.7	6.1
66512	Cerro Azul	5	27.3	5.7	24.8	69.5	6.0	5.7
63727	Balcarce	6	37.4	43.8	26.9	29.3	10.3	6.3
66514	Alto Valle	7	26.2	43.1	35.6	21.2	2.7	7.5
66515	Corrientes	8	9.0	90.3	3.3	6.4	0.5	6.0
67685	Chaco	9	23.5	13.5	49.0	37.5	4.0	6.7
67916	Reconquista	10	19.0	24.9	50.4	24.7	5.1	6.0
66295	Cerro amigo	11	30.0	38.1	32.5	29.4	6.9	6.4
67775	Barrow	12	40.5	29.7	33.2	37.1	7.3	6.9

OM: organic matter

CEC: cation exchange capacity

(1) Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle size analysis. In: Methods of Soil Analysis. Part 1. Methods Phys. Mineral. Second Ed.

(2) Chapman, H.D., 1965. Cation exchange capacity. In: Methods of Soils Analysis. Am. Soc. Agron. Second Ed., 891 – 901.

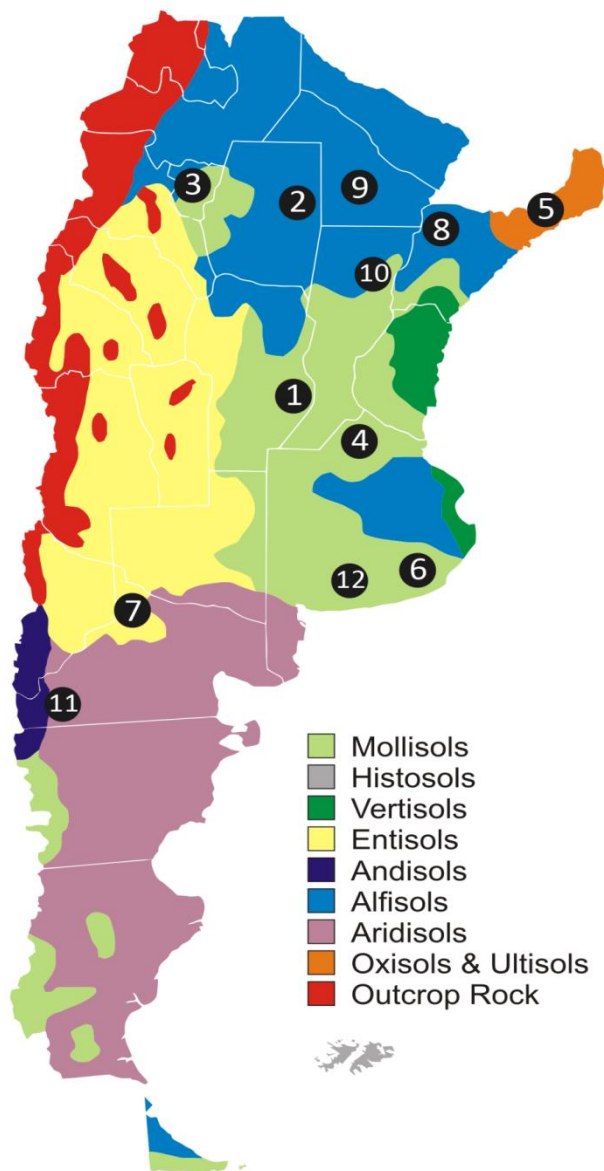
(3) Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. Am. Soc. Agron. 9, 539 – 579.

S.I. Table 2. Pesticide concentrations (mg/kg) in the soils analyzed

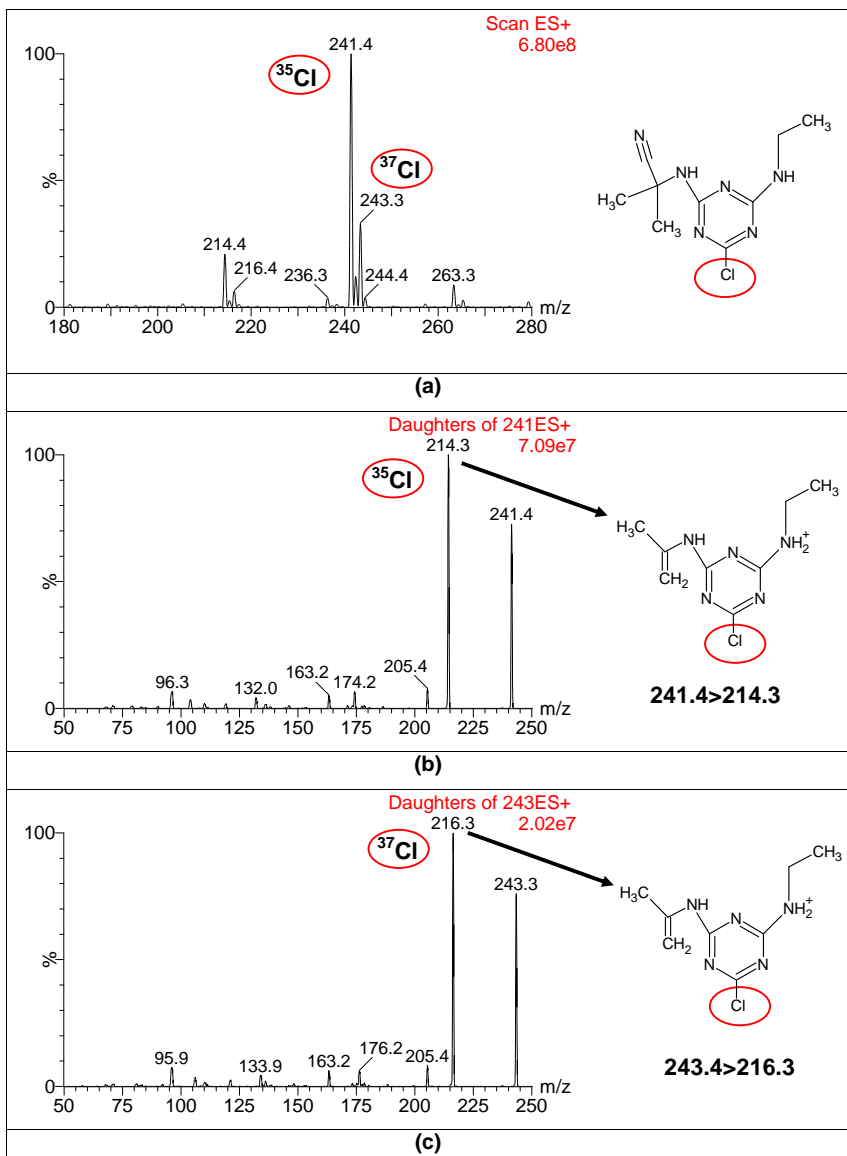
Soil Compound	Cerro Azul	Alto Valle	S del Estero	Corrientes	Cerro Amigo	Pergamino	Reconquista	Barow
Chlorpyrifos (CHLOR)	0.02*			0.004*				
Imidacloprid (IMI)						0.02*		0.07
Dimethoate (DIM)						0.03*	0.06	
Ametryn (AME)			0.03*			0.09		
Atrazine (ATZ)		0.02*			0.01*		0.06	0.07

*: estimated concentration from a response that was above S/N=10 (but below the LOQ objective of 0.05 mg/kg).

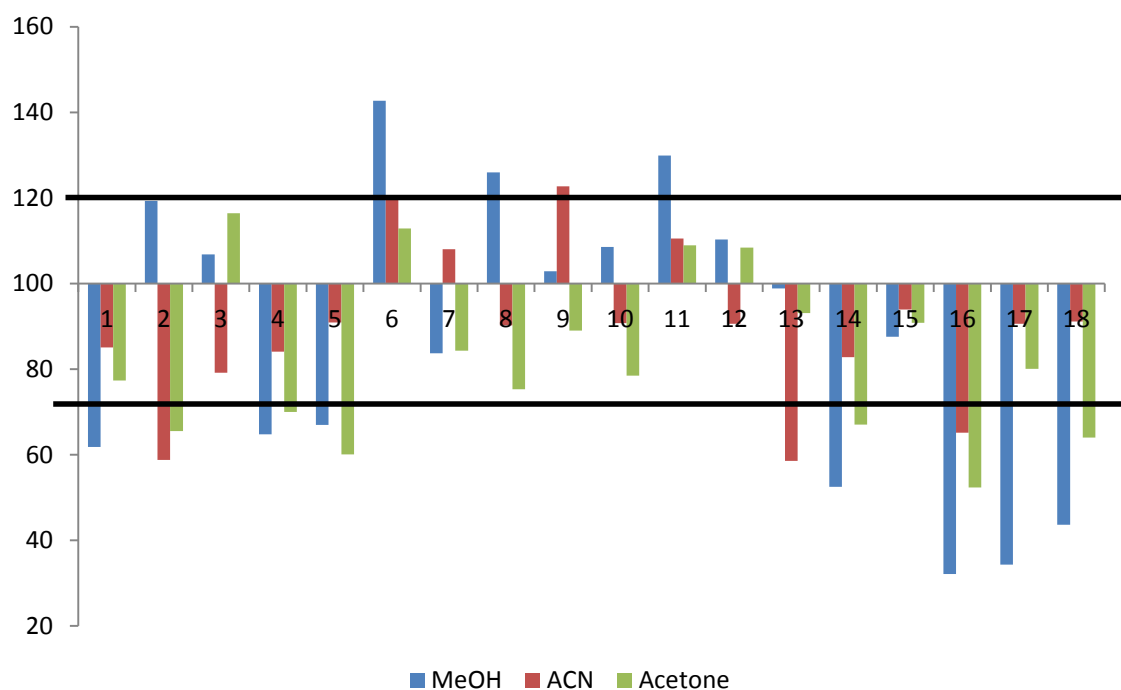
Name of Soil	Zone
Marco Juárez	1
Sgo del Estero	2
Famaillá	3
Pergamino	4
Cerro Azul	5
Balcarce	6
Alto Valle	7
Corrientes	8
Chaco	9
Reconquista	10
Cerro amigo	11
Barrow	12



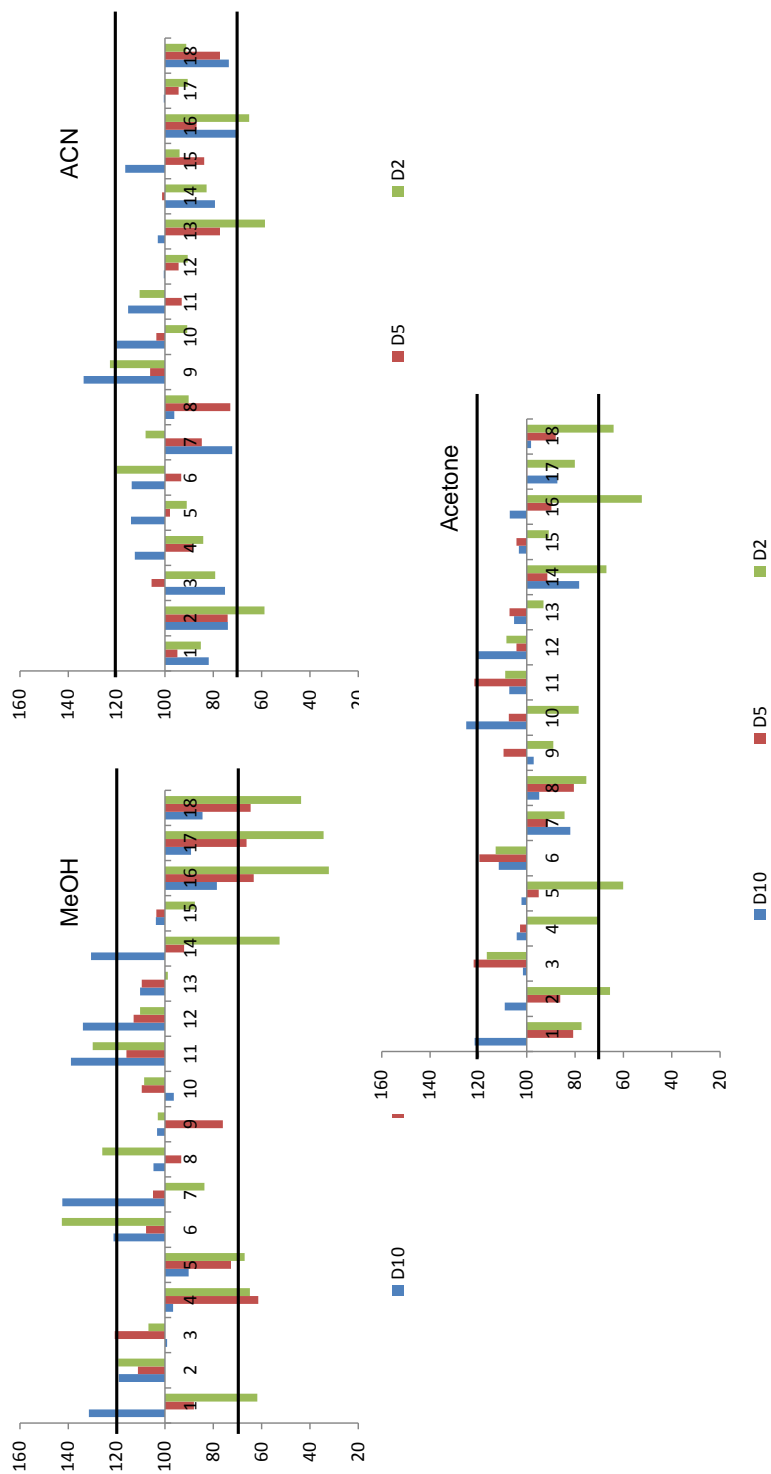
S.I. Figure 1. Location of areas where soil samples were collected



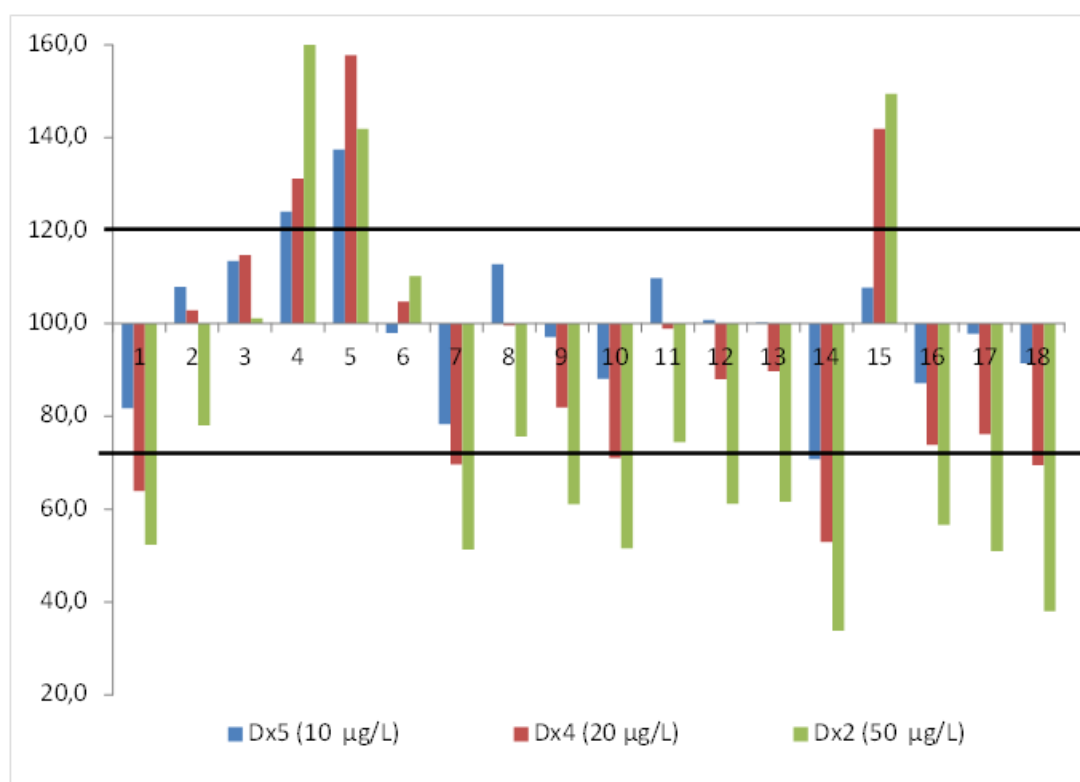
S.I. Figure 2. Example of the use of the chlorine isotopic pattern to obtain MRM transitions. (a) Cyanazine MS spectrum acquired at a cone voltage of 30 V; (b) Cyanazine MS/MS spectrum for precursor ion m/z 241 and (c) for precursor ion m/z 243 both at a collision energy of 15 eV.



S.I. Figure 3. Matrix effects for different extraction systems(dilution x 2) (50µg/L in soil extract). The name of pesticides corresponding to the different numbers can be found in Table 1.



S.I. Figure 4. Matrix effects for the extraction systems tested, after diluting soil sample extracts with water. The name of pesticides corresponding to the different numbers can be found in Table 1.



S.I. Figure 5. Matrix effects after application of QuEChERS and subsequent dilution of the soil extract with water. The name of pesticides corresponding to the different numbers can be found in Table 1

2.2.3 Discusión de los resultados

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en este trabajo multi-residual desarrollado para 18 plaguicidas (8 insecticidas, 8 herbicidas y 2 funguicidas) y aplicado a muestras de suelos procedentes de 12 campos experimentales del INTA destinados a barbecho. Las zonas muestreadas corresponden a áreas agrícolas de interés en Argentina y se indican en la **Figura 1 Supplementary Information, (artículo científico 3)**. Los resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos se encuentran en la **Tabla 1, Supplementary Information**, del mismo artículo.

Optimización cromatográfica y de las condiciones MS/MS

Los espectros MS y MS/MS se obtuvieron mediante infusión directa de disoluciones individuales de patrones de plaguicidas de 2.5 mg/L en H₂O: MeOH (50:50), a un flujo de 10 µL/min, utilizando la interfase electrospray (ESI), tanto en modo positivo como en negativo. Una vez seleccionado el ion precursor y optimizado el voltaje de cono en cada caso, se obtuvieron los espectros de los iones producto a diferentes energías de colisión.

La mayoría de los compuestos se determinaron en modo de ionización ESI positivo (15 de los 18 compuestos) y tan solo tres en modo ESI negativo (2,4D, MCPA, Fipronil). En todos los casos, se seleccionó el ion precursor $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$.

Se estudió el efecto de la adición de modificadores (NH₄Ac y HCOOH) en el momento de la infusión, comparando las intensidades de los iones obtenidos. Además, con estos modificadores, se evitó en ciertos analitos (cianizina, dimetoato, metolaclor y carbaril) la formación de sus aductos sodiados favoreciendo el ion molecular protonado $[M+H]^+$.

Se seleccionaron dos transiciones en modo SRM para cada compuesto: la más sensible (Q) para la cuantificación, y la segunda para la confirmación (q). En la medida de lo posible, se evitaron transiciones poco selectivas, con el objetivo de aumentar la selectividad del método y disminuir la posibilidad de que interferentes presentes en la matriz, que coeluyeran con los analitos, pudieran dar lugar a falsos positivos, o también a falsos negativos por incumplimiento de la relación iónica (ion ratio) esperada.

Debido a la poca abundancia de iones producto específicos en algunos de los compuestos estudiados, cuando fue posible (2,4D, MCPA, picloram y cianizina), se hizo uso de su

distribución isotópica debida a la presencia de átomos de Cl en sus moléculas. Esto permitió obtener una segunda transición con suficiente sensibilidad, que hizo posible confirmar la presencia del analito a bajos niveles de concentración. A modo de ejemplo, se muestran las **Figuras 2.6 y 2.7** para cianizina y MCPA, la primera determinada en modo de ionización positivo y el segundo en negativo.

Se probaron MeOH y ACN como disolventes orgánicos en la fase móvil, obteniéndose los mejores resultados con el MeOH. Dicho comportamiento se puede justificar, ya que este disolvente prótico facilita la ionización en positivo de la mayoría de los analitos. También se estudió el efecto de la adición a la fase móvil de distintas concentraciones de NH_4Ac y HCOOH . La presencia de 0.1 mM de NH_4Ac en la fase acuosa proporcionó los mejores resultados para los compuestos que se ionizaban en modo positivo. Sin embargo, para los compuestos “ácidos” ionizados en modo negativo (MCPA, fipronil y 2,4D) se obtuvieron malas formas de pico y baja sensibilidad. Con el fin de mejorar la forma de pico y la retención en la columna de estos compuestos, se probaron pequeños porcentajes de HCOOH en el vial preparado para la inyección en el sistema LC-MS/MS, obteniendo resultados satisfactorios con un porcentaje del 1%. A su vez, también se chequeó el volumen de inyección (10, 20, 50 μL), seleccionando 20 μL como compromiso entre forma de pico y sensibilidad.

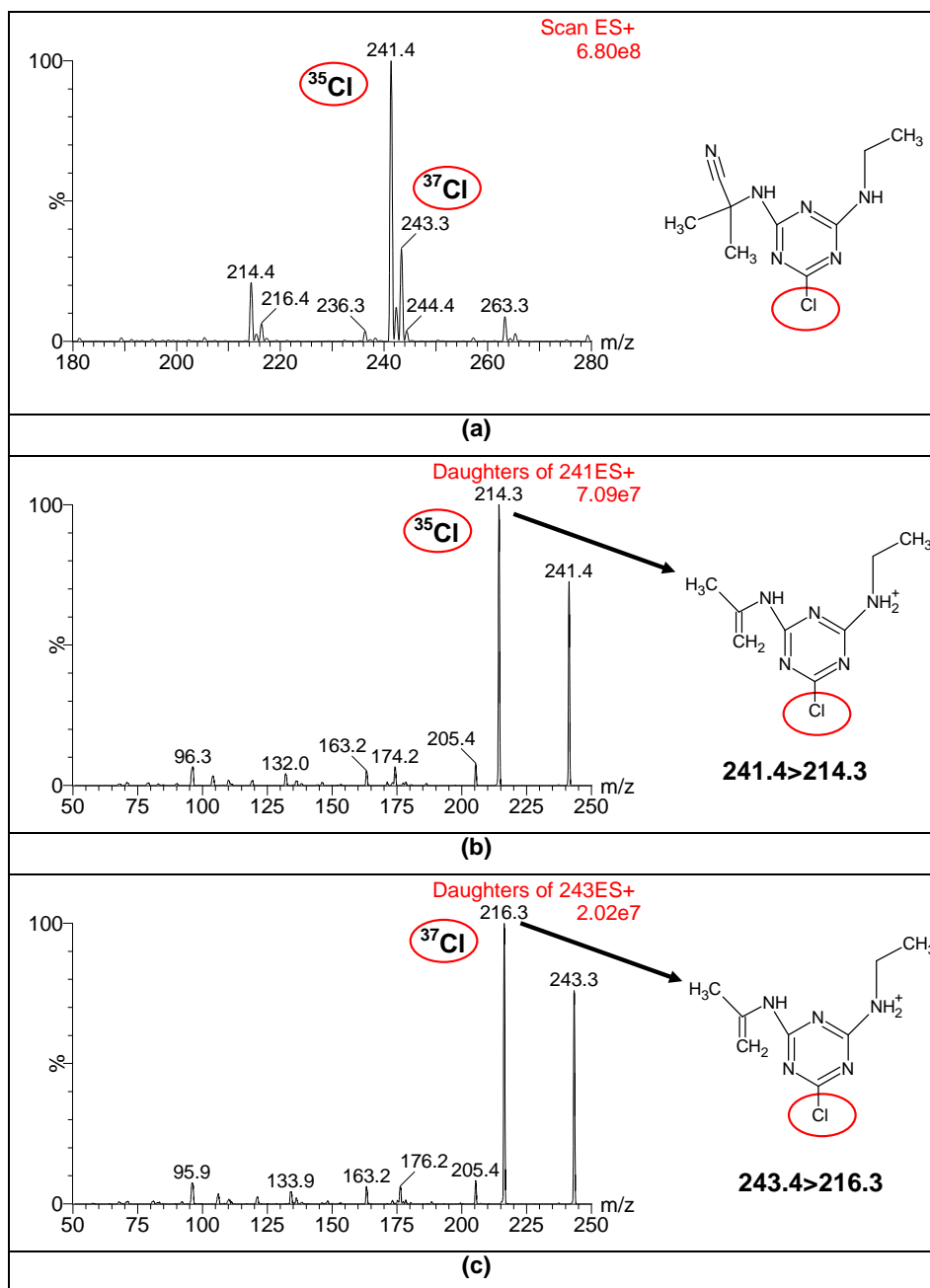


Figura 2.6. Espectro MS para Cianizina mostrando la característica distribución isotópica del Cl (ESI⁺). **(b)** Espectros MS/MS obtenidos por la fragmentación de la molécula con ³⁵Cl. **(c)** Espectros MS/MS obtenidos por la fragmentación de la molécula con ³⁷Cl.

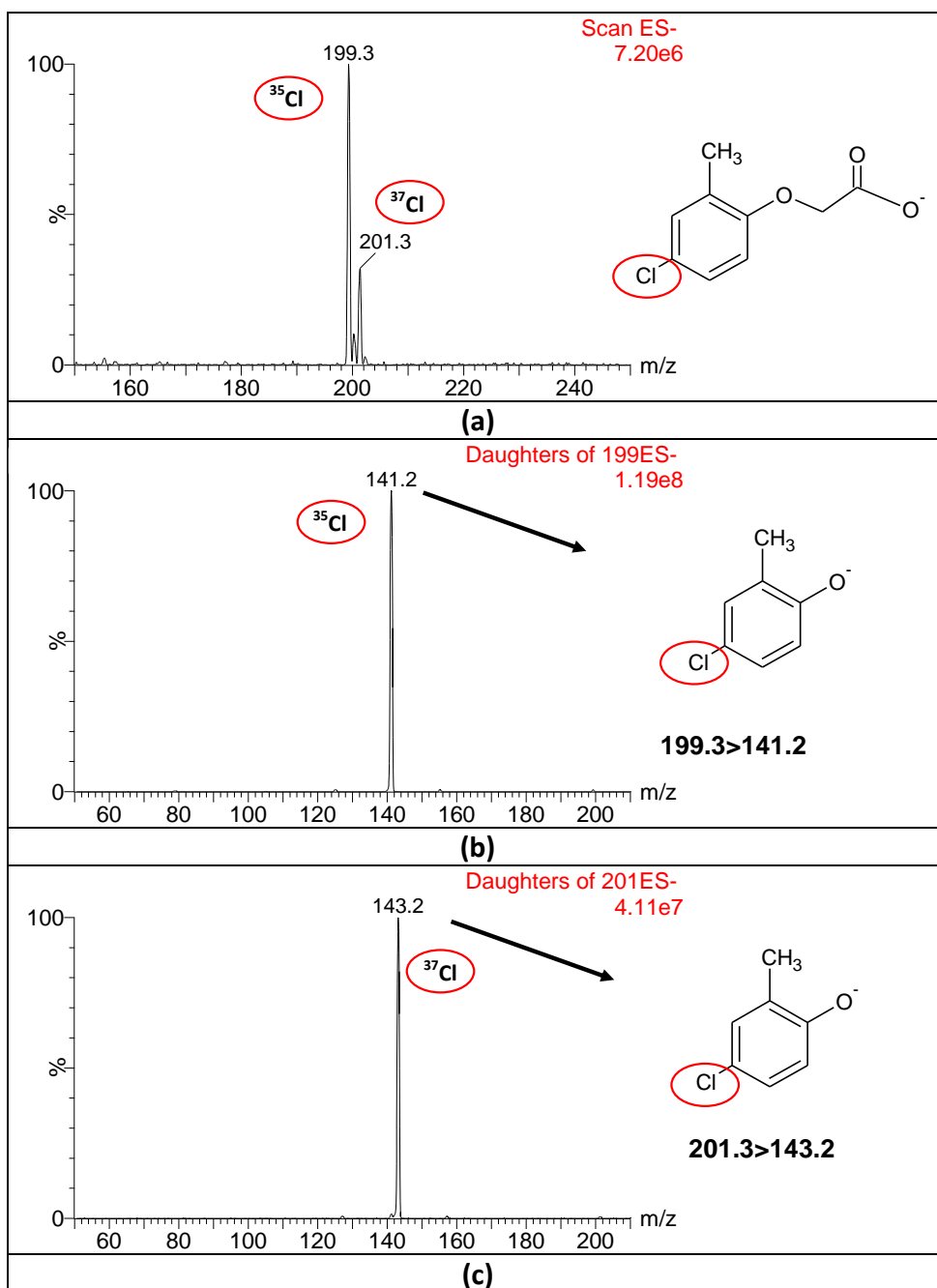


Figura 2.7 Espectro MS para MCPA mostrando la distribución isotópica característica del Cl (ESI-). **(b).** Espectros MS/MS obtenidos por la fragmentación de la molécula con ^{35}Cl . **(c)** Espectros MS/MS obtenidos por la fragmentación de la molécula con ^{37}Cl .

Las condiciones cromatográficas finalmente seleccionadas fueron: fase móvil MeOH: H₂O (0.1mM NH₄Ac), columna cromatográfica de fase reversa Brisa LC2 C₁₈ (3 µm, 50 ×2.1 mm), iniciando el gradiente en un 20% de MeOH e inyectando 20 µL de extracto acidificado al 1% con HCOOH. El primer compuesto en el cromatograma fue el picloram, a 3.1 min, y el último la pendimetalina, a 12 min. Los compuestos se distribuyeron en el método de masas en diferentes funciones, teniendo en cuenta su tiempo de retención. Trabajando con el gradiente cromatográfico, se procuró evitar, en la medida de lo posible, que no coeluyeran demasiados analitos para asegurar un número adecuado de puntos por pico (≥ 10), lo que repercutió en una buena reproducibilidad. El *dwell time* fue de 0.1 s para todos los compuestos con excepción del picloram, para el cual fue de 0.2s con objeto de mejorar la sensibilidad (ver **Tabla 1 artículo científico 3**).

Tratamiento de muestra: estudio del efecto matriz

Para el tratamiento de la muestra se probaron tres disolventes típicos para la extracción de plaguicidas en matrices ambientales y en alimentos: ACN, MeOH y ACT. Adicionalmente, también se ensayó el método de QuEChERS en su versión europea (CEN, 2008).

Para la primera experimentación, se hizo una simple extracción sólido-líquido utilizando un suelo blanco y una mezcla disolvente/agua (25mL+5mL). Se agitó durante 1 h, seguido de 15 min de ultrasonidos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó y los extractos obtenidos con cada uno de los disolventes se fortificaron a 50 ng/mL, realizando diferentes diluciones con agua (x2, x5 y x10). Con esta experiencia se pretendía conocer cuál de los tres disolventes era el más apropiado para extraer los analitos, así como la dilución a emplear intentando alcanzar un compromiso entre suficiente sensibilidad y menor ME.

Por otra parte se probó el método QuEChERS en su versión europea aplicando diferentes reactivos para el clean-up, pero evitando utilizar PSA, ya que este adsorbente no va bien para compuestos de carácter ácido, como el picloram, el 2,4D, el MCPA, entre otros.

Se realizó un estudio detallado del ME en todos los sistemas aplicados, con las distintas diluciones ensayadas. El suelo “blanco” seleccionado se tomó en Balcarce y los extractos se fortificaron a 50 ng/mL comparando su respuesta con la de un patrón en solvente a la misma concentración. El ME (%) se calculó como la relación de la señal obtenida para un patrón preparado en extracto de muestra y la del patrón de la misma concentración en solvente. Se realizaron tres réplicas para cada experiencia.

La tendencia observada para la mayoría de los analitos fue una disminución de la señal obtenida, como resultado de la supresión de la ionización en presencia de matriz, independientemente del disolvente de extracción utilizado. Cabe destacar que este hecho fue más notorio en el caso de la ACT, posiblemente porque extrajo un mayor número de componentes de la matriz en comparación con MeOH y ACN. Los resultados para estos dos últimos disolventes fueron bastante similares. Finalmente, se escogió ACN porque el ME fue algo menor, siendo las señales de la mayoría de compuestos semejantes entre extracto de muestra y solvente (ME entre 70-120%) (**Figura 3, Supplementary Information, artículo científico 3**).

Como era de esperar, el ME disminuyó al aumentar el factor de dilución debido a la menor carga de matriz, llegando a ser prácticamente irrelevante al aplicar dilución x10 (ME próximo al 100%) (**Figura 4, Supplementary Information, artículo científico 3**). Sin embargo, la dilución conllevó también la consecuente disminución de la señal, con la pérdida de sensibilidad asociada. Finalmente, se escogió dilución x2 como compromiso entre ME y sensibilidad. Esta dilución permitió alcanzar un LOQ objetivo de 0.05mg/kg para los compuestos estudiados, siendo este el valor más bajo ensayado en las muestras fortificadas y sometido a validación. Con la nueva instrumentación LC-MS/MS disponible, mucho más sensible, seguramente se podrían diluir aún más los extractos sin comprometer la consecución del LOQ objetivo, e incluso se podrían alcanzar LOQ más bajos sin demasiadas dificultades.

Las pruebas realizadas con el procedimiento QuEChERS en su versión europea CEN 15622 (extracción con ACN en medio tamponado citrato/hidrógeno citrato) condujeron a fuerte

supresión de la señal analítica para la mayoría de los analitos medidos en modo ESI positivo y exaltación de la señal para los tres compuestos medidos en modo negativo. De nuevo, se comprobó el efecto de la dilución de los extractos obtenidos, llegando a conclusiones semejantes a las de la extracción con disolventes. En este caso, se probaron diluciones x2, x4, y x5. El ME fue poco importante (ME entre 70 y 120%) al efectuar dilución x5, excepto para 2,4D y MCPA que presentaron exaltación de la señal. En extractos más concentrados (dilución x2) se observó importante ME (supresión de señal) para los analitos medidos en ESI+, con notable exaltación para los medidos en modo ESI- (**Figura 5, Supplementary Information, artículo científico 3**).

Los diferentes sistemas de clean-up aplicados (extracto dilución x2) para eliminar interferentes que afectaban a la ionización de los analitos (C18, Florisil, GCB, $\text{MgSO}_4/\text{C18}$ y $\text{MgSO}_4/\text{C18}/\text{GCB}$), no mejoraron los resultados. A pesar del clean-up aplicado, parece que el extracto de suelo, altamente concentrado (extracto 1:2), condujo a fuertes efectos matriz en este tipo de muestras.

Algunos autores han modificado el método QuEChERS utilizado en este trabajo, incluyendo la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) o la extracción líquida presurizada (PLE) (Homazava, 2014; Ivdra, 2014; Masiá, 2015). También se han introducido modificaciones en la etapa de clean-up para poder minimizar los interferentes que por naturaleza tienen los suelos, como el uso de dispersión en fase sólida con distintos dispersantes (Caldas, 2011; Chai, 2014; Mantzos, 2013; Zhang, 2012). Tal vez con algunas de estas modificaciones se podrían haber mejorado los resultados obtenidos en este trabajo, pero con los datos obtenidos se descartó finalmente el procedimiento QuEChERS por resultar más costoso en términos económicos y por no mejorar sustancialmente los resultados. Se escogió la extracción mecánica con ACN, seguida de 15 minutos en ultrasonidos, con posterior dilución x2 del extracto obtenido con agua. Usando este procedimiento, el ME fue poco relevante, lo cual permitió realizar la cuantificación con patrones externos preparados en solvente (**Figura 1, artículo científico 3**).

En la **Figura 2.8** se muestra un esquema del procedimiento finalmente aplicado a las muestras de suelos.

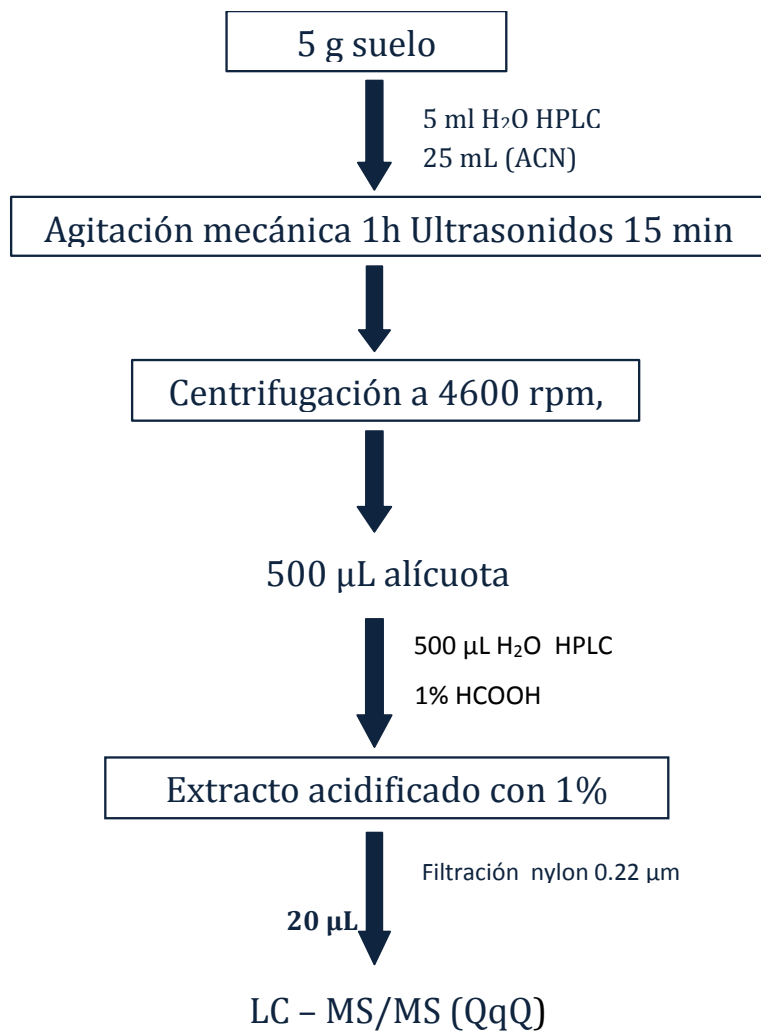


Figura 2.8 Procedimiento aplicado a los suelos objeto de estudio.

Validación del método

Una vez optimizado el método, se procedió a su validación, utilizando un suelo “blanco” procedente de Balcarce. El método se validó a dos niveles de concentración, 0.5 mg/kg y 0.05 mg/kg (equivalentes a 5 µg/L y 50 µg/L en extracto), siguiendo la guía de la Unión Europea para la validación en análisis de residuos de plaguicidas (SANCO/12571/ 2013).

El estudio de linealidad se realizó mediante la inyección por triplicado de siete disoluciones patrón en solvente, en un intervalo de concentraciones entre 1 y 100 µg/L, presentando en todos los casos coeficientes de correlación (r^2) mayores de 0.99 y residuales inferiores a $\pm 25\%$.

Se obtuvieron resultados satisfactorios para la mayoría de los compuestos, tanto en términos de precisión ($RSD < 20\%$) como de exactitud, con recuperaciones entre el 70 – 120%.

El herbicida picloram presentó recuperaciones alrededor del 50% a los dos niveles de validación, hecho que podría deberse a que este compuesto no pudo ser extraído de la matriz del suelo en su totalidad. Según algunos autores (Assis, 2011), este herbicida debe ser extraído con una solución de pH aproximadamente 7.0, ya que de lo contrario interacciona con los componentes de la matriz quedando retenido en los coloides del suelo.

Por otra parte, el herbicida MCPA presentó una leve exaltación de la señal (130%) al nivel bajo de validación. Aunque dicho valor no es exagerado, se consideró la posibilidad de corregir el ME con su propio analito marcado isotópicamente MCPA-d3. Como se esperaba, el uso del ILIS permitió una correcta cuantificación. En el caso anteriormente mencionado del picloram, esta corrección no pudo ser posible ya que no se contaba con su analito marcado en nuestro laboratorio. Junto al MCPA-d3, se incorporaron dos compuestos marcados más (dimetoato- d6, y clorpirifos – d10) que se encontraban disponibles en el laboratorio.

A pesar de que la mejor aproximación para conseguir cuantificaciones correctas sería hacer uso para cada analito de su patrón marcado isotópicamente, en la práctica resulta muy complicado al tratarse de un método multi-residuo, por la falta de disponibilidad en el

laboratorio y por el elevado coste económico que supondría la compra de un número elevado de ILIS. Algunos autores utilizan un único ILIS para corregir la respuesta de un grupo de compuestos de la misma familia, o con tiempos de retención parecidos; sin embargo, con esta aproximación no se puede asegurar una correcta cuantificación (Gracia-Lor, 2011; Marín, 2010), motivo por el cual se descartó la corrección con ILIS para todos los compuestos incluidos en el método.

Por todo lo indicado, la cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo con patrones en solventes, incluyendo en cada secuencia de análisis un buen número de QCs. El método validado se aplicó a un total de 11 muestras de suelos, cada una de las cuales se analizó junto con su correspondiente QC preparado al nivel de 0.5 mg/kg. Este QC para cada suelo analizado permitió aplicar para cada analito y muestra su propio factor de corrección en caso necesario (recuperaciones fuera del rango aceptable). En conjunto, los resultados obtenidos para la mayoría de los QCs analizados fueron altamente satisfactorios, con recuperaciones entre 70 y 120%, a pesar de que podrían haberse aceptado recuperaciones entre 60–140%, tal como indica la guía SANCO para valores individuales de recuperación. La única excepción fue el picloram (60%) debido, seguramente, a su incompleta extracción (**Tabla 3, artículo científico 3**).

Los suelos analizados eran presumiblemente “blancos” procedentes de diferentes zonas agrícolas de Argentina, ya que las parcelas donde se tomaron no habían estado sometidas a prácticas agrícolas durante varios años. Sus propiedades físico-químicas fueron muy diversas, con importantes diferencias en el contenido de SOM (entre 0.5 y 10.3%), arcillas (entre 6.4 y 69.5%), CIC (entre 9 y 40.5 cmol kg⁻¹), y pH (entre 5.7 y 7.5). Con su análisis, se pretendió demostrar la robustez del método, ya que el suelo es una matriz poco homogénea, por lo que un método que funcione bien en un cierto suelo puede ser totalmente inapropiado para otros. En este contexto, es importante demostrar que la metodología desarrollada es de aplicación a distintos tipos de suelos.

Análisis de muestras

De los 11 suelos argentinos analizados, en 9 de ellos se detectaron positivos, normalmente a nivel igual o inferior al LOQ objetivo (0.05 mg/kg). Entre los analitos detectados, se encontraban tres insecticidas (clorpirifos, imidacloprid, dimetoato) y dos herbicidas (ametrina, atrazina). La identificación de los analitos en las muestras se llevó a cabo mediante la adquisición de dos transiciones MS/MS y la medida de la relación q/Q , con desviaciones máximas con respecto al patrón de referencia del $\pm 30\%$. Además, para confirmar un positivo fue necesario que el tiempo de retención estuviera dentro de ± 0.2 min comparado con el patrón de referencia (SANCO/12571/, 2013). La presencia plaguicidas en estos suelos, a bajas concentraciones (**Figura 2.9 y 2.10**), podría ser debida a la deriva por el viento en la aplicación en zonas próximas y/o posible contaminación por arrastre por escorrentía superficial después de fuertes lluvias.

Los LODs obtenidos para $S/N=3$ fueron inferiores a 1 $\mu\text{g/kg}$ para la mayoría de los analitos (16 de 18). Estos valores, unidos al LOQ objetivo de 0.05 mg/kg, indican que la metodología desarrollada es apropiada para el control de residuos de plaguicidas en suelos, a bajos niveles de concentración.

En un futuro próximo está previsto implementar esta metodología en laboratorios del INTA para realizar el control de plaguicidas en suelos argentinos procedentes de áreas de intensa actividad agrícola.

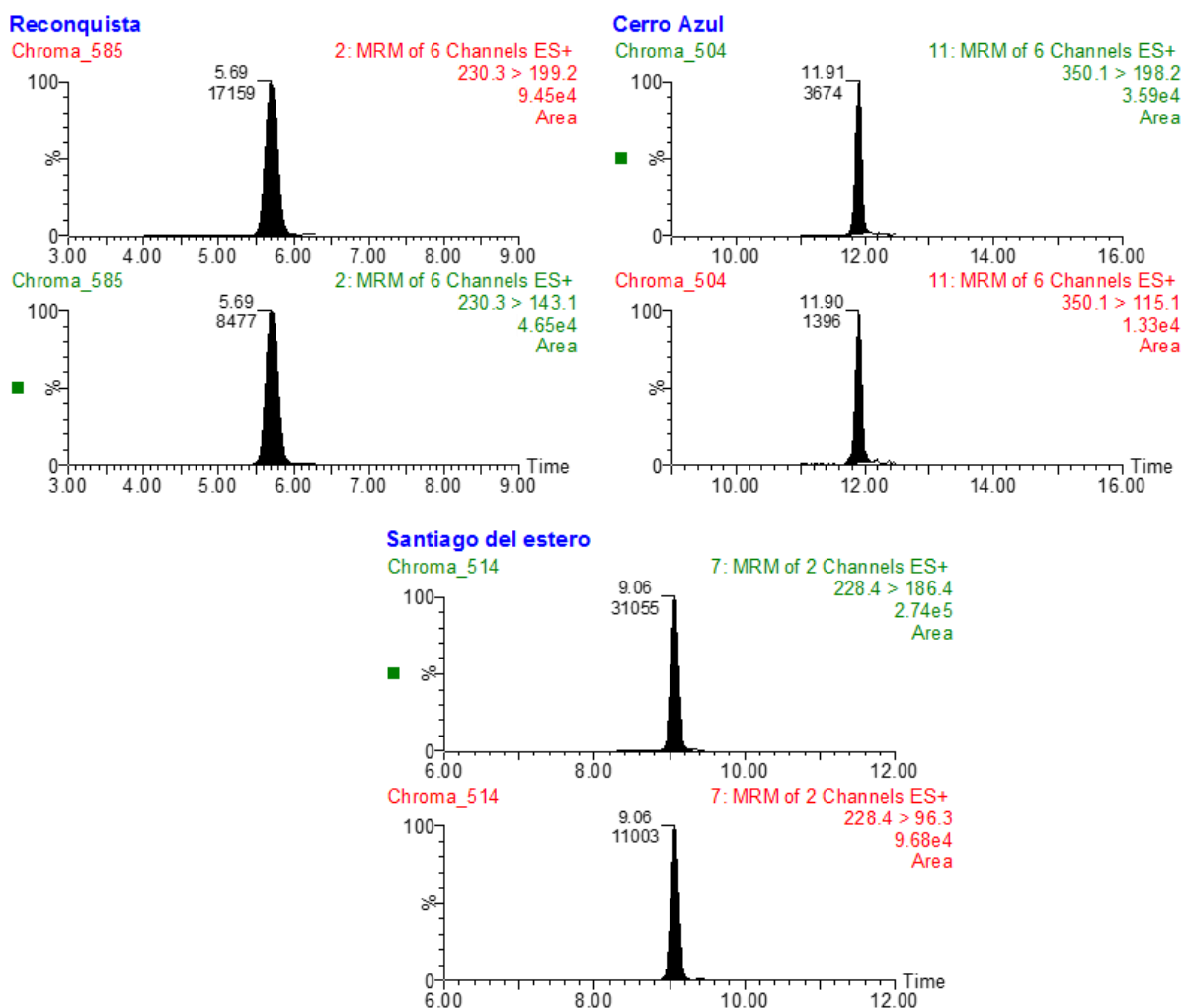


Figura 2.9 Positivos encontrados en distintos suelos para el herbicida atrazina (ATZ)

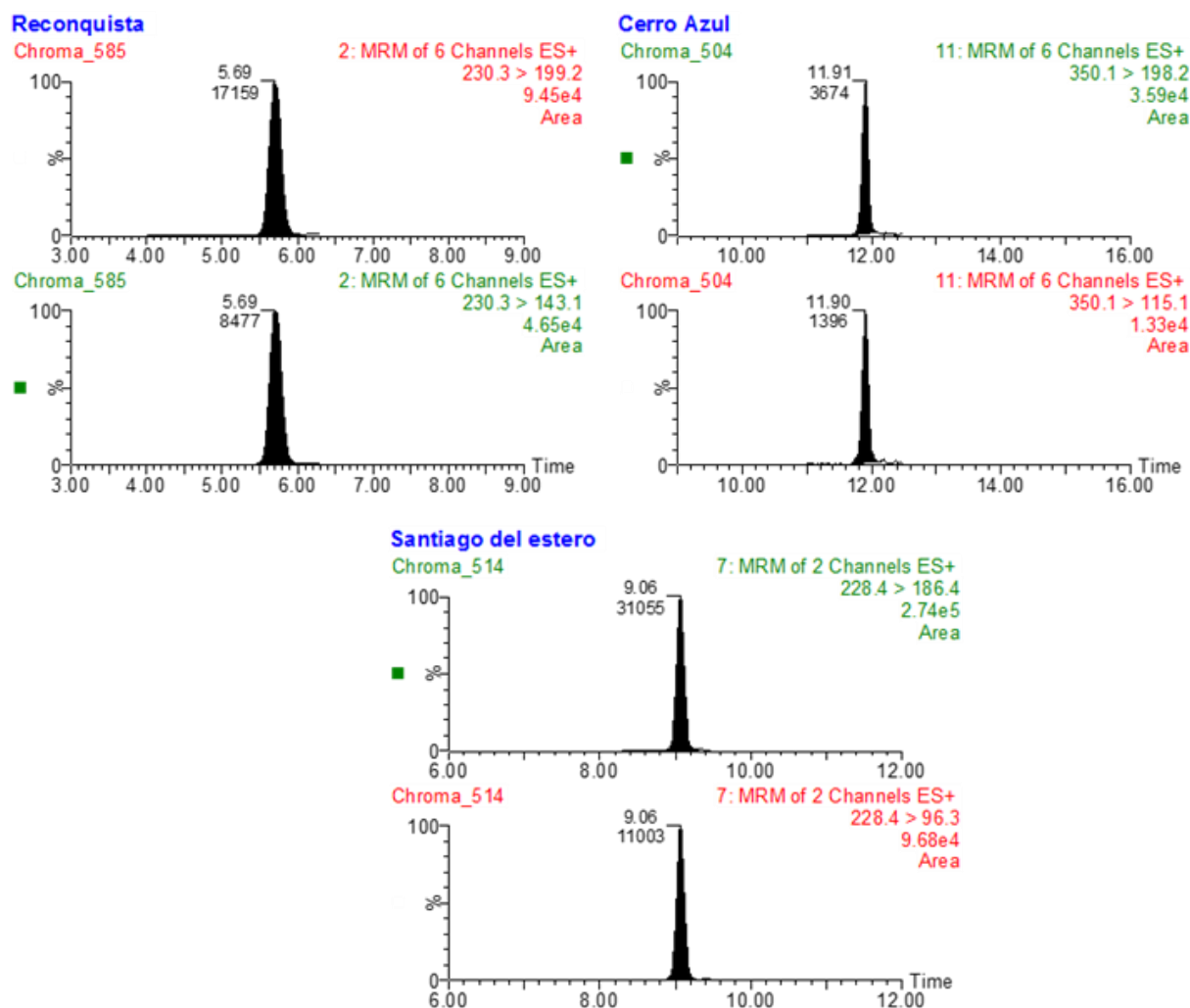
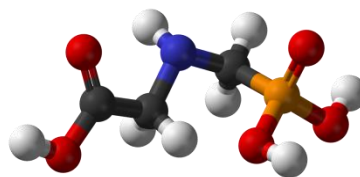


Figura 2.10. Positivos encontrados para los distintos suelos analizados para clorpirifos (CHLOR), ametrina (AME) y dimetoato (DIM).

Capítulo 3

Determinación de residuos de glifosato y AMPA en suelos y productos vegetales mediante LC-MS/MS



3.1. Introducción

El glifosato (GLY) [N-(phosphonomethyl)glycine] es posiblemente el herbicida más utilizado en la actualidad en todo el planeta. Introducido por Monsanto en la década de los 70 como principio activo del formulado Round Up®, presenta una acción sistemática, lo que le confiere considerable movilidad dentro de la planta. Es un herbicida de post-emergencia, no selectivo, y de amplio espectro, utilizado para el control de las malas hierbas y arbustos, en especial los perennes (Albers, 2009; Gomez, 2009).

Se trata de un ácido orgánico, de bajo peso molecular (Pm 169.1 g/mol), con fórmula empírica $C_3H_8NO_5P$. Es un sólido blanco, inodoro, altamente soluble en agua (12000 mg/L a 25°C) y poco soluble en disolventes orgánicos. Se enmarca dentro de la categoría de compuestos que contienen grupos fosfónico, amino y ácido. Se formula generalmente como sal isopropilamina (IPA). Suele usarse en formulaciones acuosas a una concentración de 356 g/L como ácido libre, o 480 g/L como sal IPA, añadiendo un surfactante para ayudar a que se incorpore en la superficie de la planta, mejorando así su efectividad.

Las características físico-químicas del GLY son muy diferentes a las de la mayoría de herbicidas, debido a su carácter anfótero y elevada polaridad. Sus propiedades anfóteras se deben a la presencia de grupos ácidos y básicos en su molécula. Con cuatro pKas característicos ($pK_1=0.8$, $pK_2=2.2$, $pK_3=5.5$, $pK_4=10.1$) se encuentra normalmente en forma iónica (generalmente con carga neta negativa en casi toda la escala de pH, aunque puede presentar carga positiva a $pH<1$). Únicamente, en un margen estrecho de pH en medio ácido (aproximadamente entre pH 0.8 y 2) se encuentra con carga neta neutra, aunque presentado cargas parciales negativas (pérdida del protón más ácido del grupo fosfónico) y positivas (protonación del grupo amino) (Albers, 2009; Miles, 1988).

En la **Figura 3.1** se muestra la estructura química del GLY y sus constantes de disociación ácido-base de acuerdo con la bibliografía. Las particulares características físico-químicas del GLY afectan de modo importante a su comportamiento en el medio ambiente suelo-agua, así como a su determinación analítica, la cual resulta extraordinariamente dificultosa, especialmente a niveles de sub-ppb.

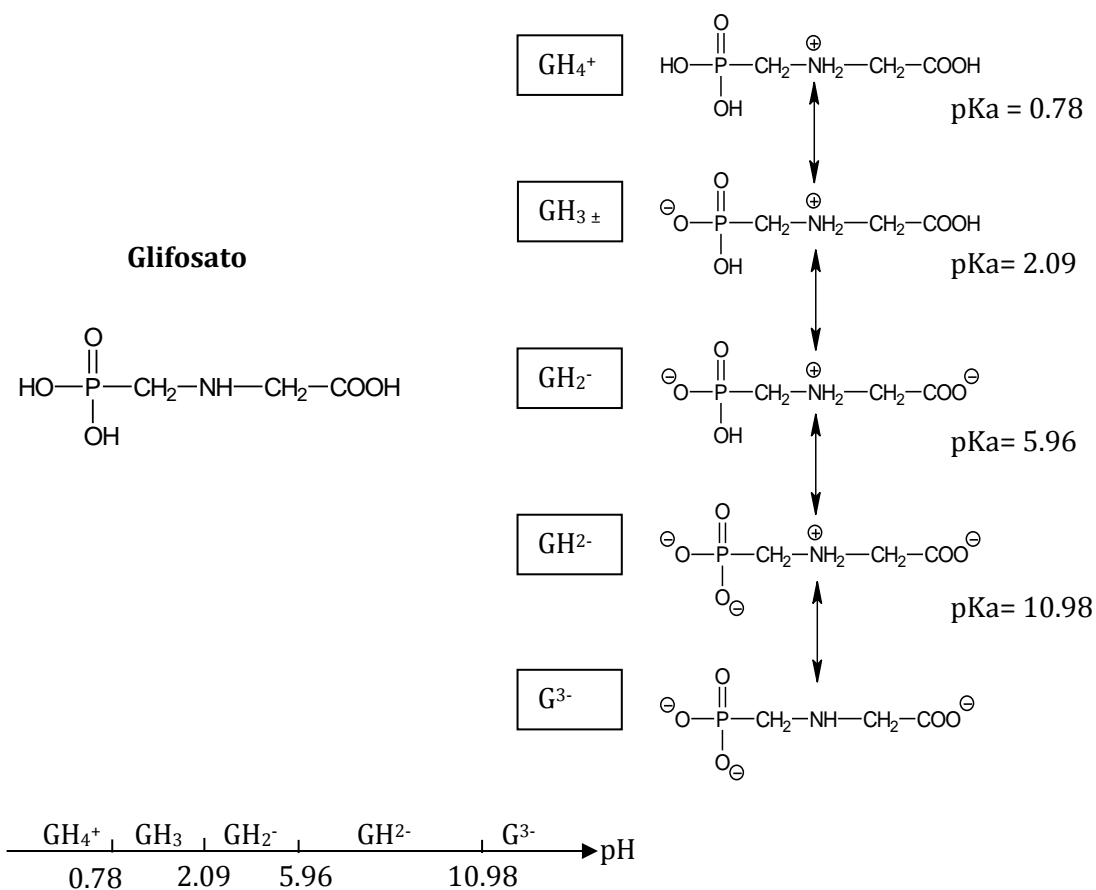


Figura 3.1 Estructura química del GLY. Constantes de disociación y equilibrios ácido-base correspondientes (modificado de You, 2003).

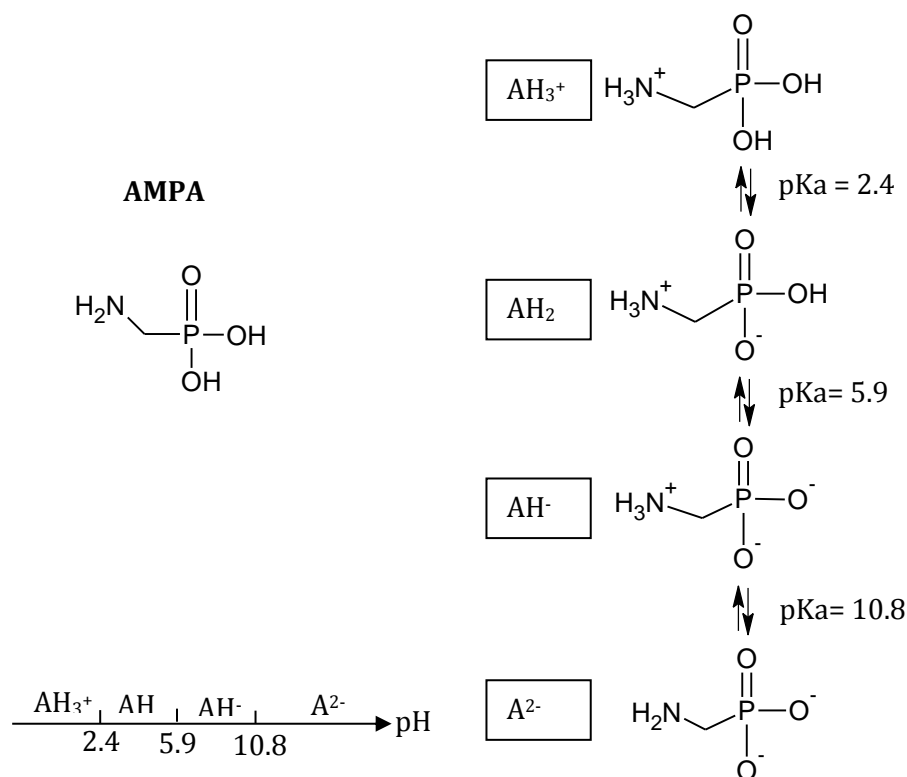


Figura 3.2 Estructura química del AMPA. Constantes de disociación y equilibrios ácido-base correspondientes (modificado de You, 2003).

Su metabolito/producto de degradación más importante y conocido, tanto en suelos como en plantas, es el ácido aminometilfosfónico (AMPA), cuya estructura y propiedades ácido-base se muestran en la **Figura 3.2** Se trata de un metabolito, no muy persistente, que presenta mayor movilidad que GLY en el suelo (Annett, 2014; Veiga, 2001).

Una vez aplicado directamente a las hojas, es absorbido rápidamente y transportado vía simplasto por toda la planta a través de los tallos y las raíces. Es particularmente efectivo porque la mayoría de las plantas no lo metabolizan, lo que explica su acción no selectiva. Solamente los cultivos modificados genéticamente son resistentes a este herbicida y pueden llegar a metabolizarlo considerablemente (Herrera, 2011; Reddy, 2004; Prata, 2005).

El GLY ejerce su acción herbicida inhibiendo la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), localizada en el cloroplasto, impidiendo la biosíntesis de tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano) usados en la síntesis de proteínas y que son esenciales para el crecimiento y supervivencia de la mayoría de las plantas (Aparicio, 2013; Bustos, 2012; Lee, 2002; Williams, 2000). Además, puede inhibir o dificultar la acción de otras dos enzimas involucradas en otros pasos de las síntesis de los mismos aminoácidos, la clorismato mutasa y prefrenato hidrasa. Todas estas enzimas forman parte de la ruta del ácido shikimico, presente en las plantas superiores y microorganismos (Bozzo, 2010; Herrera, 2011; Reddy, 2004; Williams, 2000).

La **degradación metabólica del glifosato por las plantas** no es del todo conocida. Se cree que en algunas especies, el GLY puede ser metabolizado mediante dos rutas similares a las presentes en los microorganismos. La primera involucra la ruptura oxidativa del enlace C-N para producir AMPA y glioxilato; la segunda es por ruptura del enlace C-P por la enzima C-P liasa para generar sarcosina. El AMPA es menos fitotóxico y activo que el GLY. En el caso de la soja transgénica, genéticamente modificada (GM) y resistente al GLY Roundup Ready® (RR), la planta está protegida por una forma resistente de EPSPS, por lo que puede metabolizarlo y degradarlo (Reddy, 2004).

Aunque el GLY no se aplica directamente al suelo, sino rociando soluciones diluidas durante las etapas tempranas del crecimiento del cultivo, una parte importante del formulado puede finalizar en el suelo, por deriva en la fumigación o por arrastre con las lluvias. Su persistencia en el suelo está en función de su retención y de su (bio)degradación. Estos dos parámetros dependen, a su vez, de la composición mineralógica y de las propiedades del suelo, tanto físicas (textura del suelo- arcillas, arenas, limos y contenido de SOM), como químicas (pH, CIC y contenido de nutrientes) y microbiológicas (tipo de microorganismos presentes) (Aparicio, 2013; Bustos, 2012; Hadbook, 2004; Ismail, 2002) .

Se considera que es moderadamente persistente en el suelo, con una vida media de 2 a 197 días, o entre 10 y 100 días (media 47 días) según diferentes autores y en función del tipo de suelo, mientras que en ambientes acuáticos su vida promedio es menor y oscila entre 1 a 174 días, siendo para su metabolito AMPA de 76 a 240 días (Battaglin, 2005; Hornsby, 1996; Veiga, 2001).

Una vez en contacto con el suelo, el GLY se inactiva rápidamente debido a su adsorción más que a su degradación química o fotoquímica (Gimsing, 2004; Glass, 1987; Haney, 2000; Piccolo, 1994,). La (bio)degradación por los microorganismos del suelo también es considerada una forma importante de reducción de los niveles de GLY (Araújo, 2003; Bozzo, 2010; Mallat, 1998).

La principal vía de **biodegradación en suelos** del GLY es relativamente rápida y se produce por ruptura del enlace C-N para originar ácido glioxílico y AMPA, con posterior acción de la enzima C-P liasa, que produce la ruptura del enlace C-P, dando lugar a la formación de fosfato y metilamina, y finalmente formaldehído. La segunda ruta de degradación es mediante ruptura del enlace C-P del GLY, y conduce a la formación de fosfato y sarcosina (N-metilglicina), la cual a su vez se degrada a glicina (Annett, 2014; Herrera, 2011; Stalikas, 2001). En la **Figura 3.3** se ilustra, de forma simplificada, las rutas de degradación del GLY en el suelo.

Como consecuencia de su elevada polaridad ($\log K_{ow} -3.4$), cabe esperar que el GLY no se adsorba sobre la SOM y, de hecho, en algunos estudios se indica que la SOM no es importante en la adsorción del herbicida. Sin embargo, otros datos de la bibliografía indican exactamente lo contrario (Albers, 2009). En cualquier caso, parece que la SOM juega tan sólo un papel indirecto en cuanto la adsorción del GLY en suelos (Vereecken, 2005). Se ha descrito que la movilidad de este herbicida hacia horizontes más profundos del suelo puede estar controlada por la formación de complejos relativamente estables entre el GLY y las sustancias húmicas solubles, y ello puede provocar la contaminación de las aguas subterráneas (Ismail, 2002; Piccolo, 1994, 1996; Veiga, 2001). En cualquier caso, su comportamiento ambiental está sujeto a controversia, con muchos datos contradictorios y, en ocasiones, poco fiables.

El GLY se adsorbe fuertemente en la mayoría de suelos, mediante enlaces con las capas de silicatos, con los óxidos metálicos (principalmente, óxidos de hierro y aluminio), y materiales no cristalinos. La adsorción sobre arcillas también parece ser importante, y tiene lugar mediante interacciones electrostáticas o por enlaces de puente de hidrógeno sobre la superficie externa del material arcilloso. La complejación del GLY con cationes, como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , parece jugar un papel importante en la adsorción sobre arcillas mediante mecanismos de intercambio catiónico.

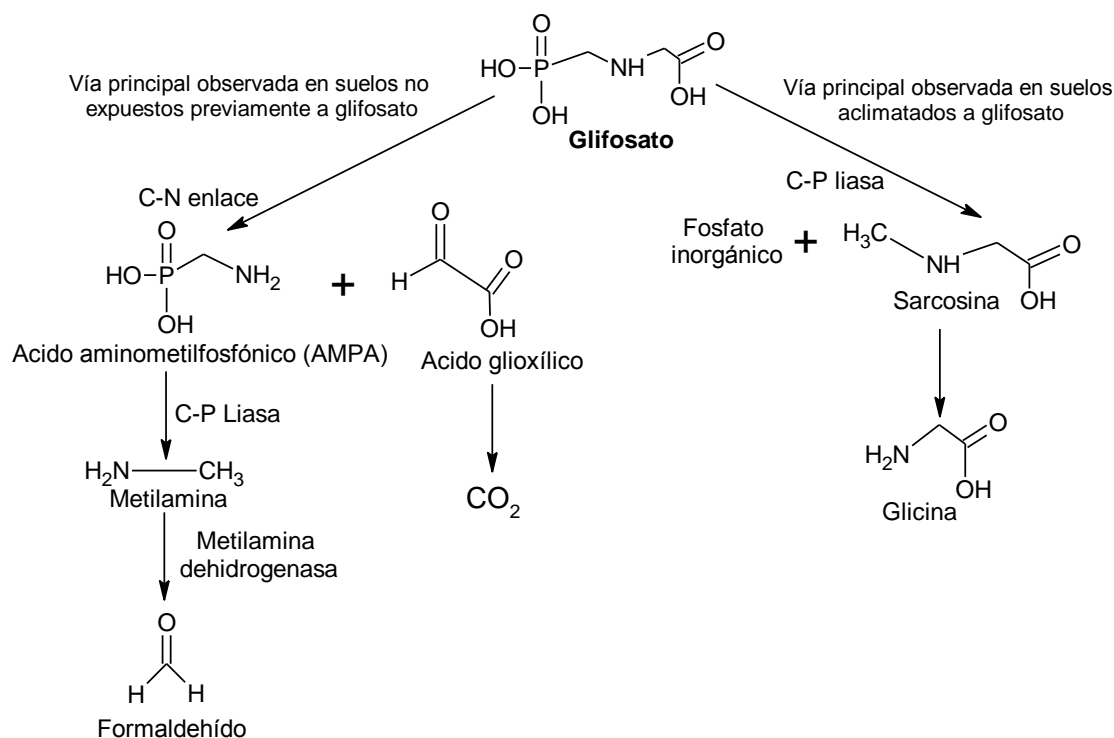


Figura 3.3 Vías de degradación del GLY en el medio ambiente del suelo (modificado de Williams, 2000).

Se han sugerido varios mecanismos de unión en la **adsorción** de este herbicida al suelo, que incluyen fuerzas electrostáticas, enlaces covalentes, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, tal como se muestra en la **Figura 3.4**

A pesar de su elevada solubilidad en agua, la mayoría de publicaciones reportan que el GLY presenta baja movilidad en suelos, como resultado de los procesos de adsorción. Según varios autores, la adsorción sería la principal responsable de la rápida inactivación del GLY, más que la degradación. Se ha descrito, asimismo, que la degradación del GLY adsorbido sobre el suelo es considerablemente más lenta que la del GLY libre. De este modo, el proceso de adsorción hace que el GLY sea más persistente en el suelo (Glass, 1987; Haney, 2000; Piccolo, 1996; Lenin, 2010; Sancho, 1996b).

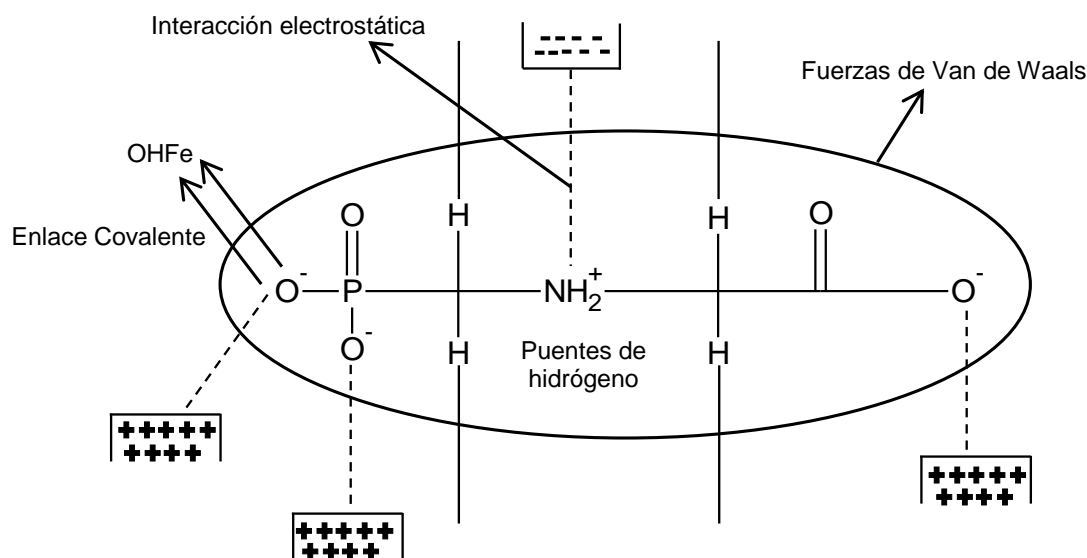


Figura 3.4 Mecanismos involucrados en la adsorción del GLY en el suelo (interacción electrostática, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogenos y enlaces covalentes) (Islas, 2013)

El ion fosfato presente en el suelo también juega un papel importante, ya que compite por los sitios de adsorción con el GLY, pues presenta una estructura similar al ión fosfonato presente en este herbicida, afectando por tanto a su adsorción y movilidad en suelos. Por ello, al aumentar la concentración de fosfato en los suelos, aumenta la biodisponibilidad del GLY haciéndolo más susceptible a la actividad microbiana (Herrera, 2011; Zhao, 2009).

La mayoría de estudios reportados en la bibliografía indican que, una vez aplicado el GLY, éste es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo sufriendo, además, una importante degradación, principalmente de tipo biológico, siendo el AMPA su metabolito mayoritario. De acuerdo con estos datos, no sería previsible su presencia en concentraciones relevantes en las aguas subterráneas y/o superficiales (Haney, 2000; Hart, 1997). Sin embargo, diversos autores han reportado niveles de GLY y AMPA del orden de ppb en aguas, especialmente en las superficiales (Battaglin, 2005; Coupe, 2012; Hanke, 2008; Kolpin, 2006; Landry, 2005; Peruzzo, 2008; Struger, 2008; Villeneuve, 2011).

De hecho, estudios realizados por nuestro grupo de investigación sobre la **presencia de GLY y AMPA en aguas** demuestran que estos compuestos se detectan habitualmente en entornos agrícolas. Así, en un estudio realizado sobre 50 muestras de aguas subterráneas y superficiales de la Comunidad Valenciana se detectó GLY en el 25% de las muestras analizadas (concentraciones entre 0.06 y 0.48 µg/L), mientras que el AMPA se detectó en el 40% de las muestras (entre 0.05 y 0.18 µg/L). La frecuente detección de AMPA, tanto en aguas como en suelos, es indicativo de la degradación del GLY en el medio ambiente y de su mayor vida promedio en ambientes acuáticos (Hernández, 2008; Hidalgo, 2004; Ibáñez, 2005, 2006).

En lo relativo a la presencia de **GLY en vegetales**, cabe señalar que existen MRLs para varios cultivos. En la **tabla 3.1** se recogen los MRLs para productos vegetales, incluyendo cereales. Puede apreciarse que tan sólo en algunos cultivos existen MRLs superiores al límite de determinación del método analítico (marcado con * en la tabla) (European Union Decision, 2005).

Tabla. 3.1 Límites Máximos de Residuos (MRLs) propuestos por la EFSA para productos vegetales (anexo I parte A Reglamento 396/2005).

Número de código	Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los MRLs (a)	Glifosato mg/kg
260000	Leguminosas	0.1*
260010	Judías (con vaina)	0.1*
260020	Judías (sin vaina)	0.1*
260030	Guisantes (con vaina)	0.1*
260040	Guisantes (sin vaina)	0.1*
260050	Lentejas	0.1*
300000	Leguminosas secas	
300010	Judías	2
300020	Lentejas	10
300030	Guisantes	10
300040	Altramuces	10
300990	Las demás (2)	0.1*
400000	Frutas y semillas oleaginosas	
401070	Habas de soja	20
500000	Cereales	
500010	Cebada	20
500020	Alforfón y otros seudocereales	0.1*
500030	Maíz	1
500040	Mijo	0.1*
500050	Avena	20
500060	Arroz	0.1*
500070	Centeno	10
500080	Sorgo	20
500090	Trigo	10
500990	Los demás (2)	0.1*

*Valor por defecto correspondiente al límite de determinación del método analítico.

La **definición de residuo** propuesta por la EFSA es “glifosato”, y no se incluye el metabolito AMPA ni ninguno de sus otros metabolitos. Sin embargo, la situación es diferente en el caso de **cultivos transgénicos**, lo cual tiene notables repercusiones ya que existen variedades transgénicas, sobretudo de soja y maíz, resistentes a este herbicida.

El GLY se usa tanto en cultivos convencionales como en los resistentes/tolerantes al mismo. Dentro de estos últimos, cabe distinguir dos tipos: 1) Cultivos tolerantes, que contienen el gen modificado 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), que se suelen conocer como “cultivos EPSPS”; 2) Cultivos tolerantes que contienen el gen glyphosate-N-acetyltransferasa (GAT), conocidos habitualmente como “cultivos GAT”. Los cultivos EPSPS son tolerantes al GLY pero básicamente lo metabolizan del mismo modo que los convencionales, por lo que la definición de residuo en estos cultivos es la misma que para los convencionales: “solo glifosato”. Sin embargo, los estudios de metabolismo realizados en cultivos GAT demuestran que el GLY se inactiva convirtiéndose en N-acetil-glifosato, siguiendo una ruta metabólica diferente a la de los cultivos convencionales y EPSPS. En los cultivos tolerantes GAT, se forman, por tanto, nuevos metabolitos que no se observan en el resto. El principal metabolito encontrado en maíz, soja, o colza GAT es el N-acetil-glifosato. El GLY inalterado, su metabolito más conocido AMPA, y el N-acetil-AMPA, se encuentran a muy bajas concentraciones en estos cultivos. En consecuencia, parece evidente que “solo glifosato” no es un buen marcador para monitorizar el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas en transgénicos tipo GAT (EFSA, 2009, 2013, 2015).

En consecuencia, la EFSA ha propuesto tres opciones para la definición de residuo en los cultivos GAT, con fines regulatorios en cuanto a cumplimiento de MRLs, discutiendo las ventajas y desventajas de cada una: 1) GLY; 2) suma de GLY + N-acetil-GLY, expresada como GLY; 3) N-acetil-GLY (estableciendo MRLs separados para N-acetil-GLY además de los ya existentes para GLY). Para la evaluación de riesgos, la EFSA propone cambiar la definición de residuo a “suma de GLY, N-acetil-GLY, AMPA y N-acetil-AMPA, expresada como GLY” con el fin de cubrir todos los metabolitos que pueden encontrarse en cultivos convencionales y modificados genéticamente (EFSA, 2015; Food and Authority, 2013). En la **figura 3.5** se muestra la actividad enzimática de la proteína GAT.

Esta situación abre un nuevo panorama analítico, pues a las reconocidas dificultades encontradas para la determinación de residuos de GLY, habría que añadir las del AMPA y los metabolitos acetilados.

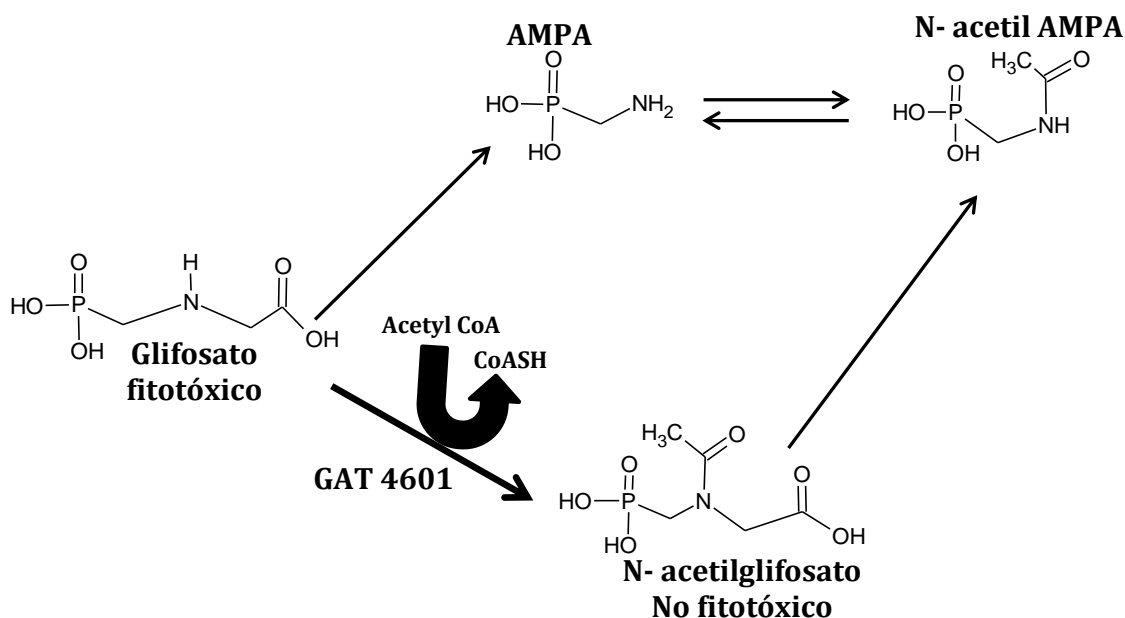


Figura 3.5 Actividad enzimática de la proteína GAT (FAO, 2005).

En esta Tesis no se han considerado los cultivos transgénicos, por lo que no se ha abordado la determinación de los metabolitos acetilados. El trabajo se ha centrado en GLY y su principal metabolito AMPA, en el caso de suelos, y tan sólo GLY en el caso de productos vegetales, atendiendo a la definición de residuo, tal como se verá más adelante en este mismo capítulo.

Una de las principales causas de controversia sobre el GLY, especialmente en lo relativo a su impacto ambiental sobre suelos y aguas, se encuentra, sin duda, en la **dificultad analítica** que conlleva su determinación a nivel de residuos. Ello es consecuencia de su carácter iónico/anfótero, que se traduce en una elevada solubilidad en agua, de su baja volatilidad, bajo peso molecular y falta de grupos químicos en su estructura que faciliten la detección. Más difícil resulta todavía la determinación de residuos en suelos, debido a la gran complejidad de las muestras y a la presencia de numerosos interferentes.

En general, la mayoría de los métodos desarrollados hasta la fecha, tanto por cromatografía líquida (LC) como por cromatografía de gases (GC), han requerido algún tipo de **derivatización** con el fin de posibilitar su análisis. Los métodos basados en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) son sensibles, pero la preparación de

muestra es complicada y requiere mucha manipulación, ya que todos los grupos iónicos deben ser derivatizados (Borjesson, 2000; Hanke, 2008; Rueppel, 1976; Stalikas, 2001). En GC se han utilizado diferentes reactivos derivatizantes, como mezclas de trifluoroetanol y anhídrido trifluoroacético, con el fin de aumentar la volatilidad (Andreu, 2004; Reddy, 2004; Tseng, 2004).

Debido a las características físico-químicas de este herbicida, así como de su metabolito AMPA, su determinación se adapta mejor a LC, técnica más adecuada para compuestos polares y poco volátiles. La falta de grupos químicos adecuados (grupos cromóforos, fluorogénicos, o que absorban en el UV) ha limitado su análisis con detectores convencionales, como ultravioleta, barrido de diodos o fluorescencia. Por ello, ha sido habitual realizar una etapa de derivatización con el fin de formar derivados fluorescentes y así mejorar la detección. Esta etapa de derivatización también es necesaria para reducir el carácter polar del GLY y facilitar su retención en la columna cromatográfica (generalmente tipo fase reversa, C18). Los métodos más usados se han basado en derivatizaciones pre-columna con 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl), reactivo utilizado para derivatizar aminas primarias (AMPA) y secundarias (GLY), y post-columna con orto-ftaldehído (OPA), reactivo utilizado para derivatizar aminas primarias, para dar en ambos casos derivados altamente fluorescentes. Prueba de ello, son las numerosas referencias bibliográficas existentes (Amarante, 2002; Araújo, 2003; Báez, 2014; Bernal, 2012; Bustos, 2012; Cowell, 1986; Druart, 2011; Ghanem, 2007a; Glass, 1983; Goscinny, 2012; Herrera, 2011; Hidalgo, 2004; Kruve, 2011; Mallat, 1998; Moye, 1979; Nedelkoska, 2004; Patsias, 2001; Roseboom, 1982; Sancho, 1996a; Stalikas, 2001; Stoytcheva, 2011; Syan, 2014).

También se han propuesto otros reactivos para su derivatización en métodos basados en LC. Tal es el caso del 3,6-dimethoxy-9-phenyl-9H-carbazole-1-sulfonyl chloride (DPCS-Cl) para la determinación de GLY y AMPA en muestras de soja (Zhang, 2013) o de p-toluenesulphonyl chloride (TsCl) en el análisis de zumos de frutas (Khrolenko, 2005). En el caso de aguas, se han aplicado varios reactivos derivatizantes: 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF) (Qian, 2009); 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride (MOBS-F) (Sun, 2010); o ninhydrina, usado como reactivo cromóforo (Bhaskara, 2006); 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) (Colin, 2000; Duran, 2005). Para la determinación de residuos en suelos, se ha usado el 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl (DNP) (Lundgren, 1986) y el 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) (Islas, 2014).

Recientemente, se ha publicado una revisión que recoge diversas reacciones de derivatización usadas para la determinación de GLY y AMPA mediante técnicas cromatográficas (Arkan, 2015).

Cabe concluir que entre todos los reactivos propuestos, el más usado es el FMOC. Nuestro grupo de investigación, pionero en la determinación de residuos de GLY y AMPA en suelos, aguas y productos vegetales, ha usado la derivatización previa con FMOC en todos los métodos analíticos desarrollados hasta el momento. Los métodos diseñados en la década de los 90 en colaboración con el Dr. Elbert Hogendoorn, del RIVM Holandés, estaban basados en acoplamiento LC-LC (column switching) usando detección por fluorescencia. Esta técnica permitió determinar niveles de sub-ppb en aguas (Hidalgo, 2004; Sancho, 1996a), y muy bajos niveles de concentración en suelos (Sancho, 1996b) y productos vegetales (Hernández, 2000; Hogendoorn, 1999). La técnica LC-LC-FD proporcionó excelentes resultados y supuso un notable avance en el análisis de residuos de GLY, llegando a alcanzar los bajos límites de detección y de cuantificación requeridos en este tipo de análisis.

Las metodologías analíticas para la determinación de residuos de GLY y AMPA, al igual que para la inmensa mayoría de plaguicidas, sufrieron una auténtica revolución con la irrupción de la técnica LC-MS en los laboratorios analíticos, en particular LC-MS/MS con equipos de QqQ. **LC-MS/MS** es una técnica muy poderosa y se muestra como la más atractiva actualmente para el análisis de residuos de plaguicidas polares. Por ello, en los últimos años, se han reportado varios métodos para GLY y AMPA basados en dicha técnica. Sin embargo, a pesar de sus excelentes características analíticas, los métodos basados en LC-MS/MS también requieren normalmente una etapa de derivatización previa, con el fin de mejorar la separación cromatográfica y facilitar la retención de GLY y AMPA en el proceso de pre-concentración (ejemplo, SPE en análisis de aguas). LC-MS/MS, generalmente con QqQ, se ha aplicado con éxito a la determinación de residuos de GLY en aguas, suelos, lodos y productos vegetales (soja, maíz, arroz, y cereales en general), (Aparicio, 2013; Coupe, 2012; Druart, 2011; Ghanem, 2007a, 2007b; Gonzalez-Martinez, 2005; Hanke, 2008; Ibáñez, 2005, 2006; Kolpin, 2006; Kruve, 2011; Lee, 2002; Marek, 2013; Peruzzo, 2008; Raina-Fulton, 2014; Syan, 2014; Vreeken, 1998).

En nuestro grupo de investigación, las metodologías desarrolladas inicialmente, basadas en LC-LC-FD, dieron paso a principios de la década de 2000 a métodos basados en LC-MS/MS.

Así, la determinación de GLY y AMPA en aguas se llevó a cabo, previa derivatización con FMOC en medio borato, usando una pre-concentración en línea (SPE-LC-MS/MS). Mediante esta aproximación analítica fue posible determinar de modo fiable niveles de GLY y AMPA del orden de unos pocos ng/L, usando menos de 5mL de muestra. Para la determinación en suelos, no fue necesaria la pre-concentración en línea, sino más bien al contrario, la dilución de los extractos alcalinos antes de la derivatización (Ibáñez, 2005, 2006).

En los últimos años, se observa una clara tendencia hacia **métodos directos** en los que se evita la etapa de derivatización. Para ello, se requiere del uso de columnas cromatográficas adecuadas, capaces de retener de forma eficiente y reproducible el GLY. Esto no resulta sencillo, y menos en métodos basados en LC-MS, ya que la cromatografía iónica (IC) se muestra como la alternativa más razonable. Sin embargo, las fases móviles y los modificadores usados en IC no son los más adecuados para detección por espectrometría de masas. Se han usado diversos tipos de columnas, destacando las de intercambio iónico, fuerte o débil, las de tipo HILIC, las columnas en modo mixto, e incluso las de fase inversa tipo C₁₈ o C₈. También se han propuesto alternativas rápidas para la detección y estimación semi-cuantitativa inyectando directamente los extractos de muestra en modo de “Flow Injection Analysis” (FIA), sin utilizar columna cromatográfica (Mol, 2014).

Dada la importancia que la cromatografía tipo HILIC está adquiriendo en los últimos años para la separación de contaminantes orgánicos polares, y en particular para el GLY, a continuación se dedica un apartado específicamente a este tema.

Cromatografía HILIC

Son varios los mecanismos de separación descritos en LC, principalmente partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión por tamaños. Además, LC se puede usar tanto en fase inversa (RPLC) como en fase normal (NPLC). Ambas tienen importantes campos de aplicación en la determinación de compuestos orgánicos. Como es bien conocido, en NPLC la fase estacionaria es más polar (ej. alúmina, sílica) que la fase móvil (ej. hexano, o mezclas hexano-acetato de etilo, entre otros). En NPLC la retención de los analitos aumenta cuando disminuye la polaridad en la fase móvil; de este modo, los analitos polares se retienen más que los no polares. Sin embargo, en RPLC la situación es la inversa: la fase estacionaria es menos polar (ej. C_{18}) que la fase móvil (ej. MeOH: H_2O). Los sistemas basados en RPLC se han usado con éxito en múltiples métodos para la determinación de contaminantes orgánicos, existiendo numerosas referencias en la bibliografía. Aunque RPLC ha sido el sistema de separación más utilizado, los métodos basados en NPLC están aumentando su popularidad de forma notable en los últimos años.

La cromatografía con columnas HILIC es una técnica adecuada para la separación de compuestos muy polares, e incluso iónicos. En contraste con la cromatografía de fase inversa, la retención de compuestos polares es mayor que la de los compuestos no polares. Este modo de cromatografía se ha utilizado para el análisis de azúcares, ácidos nucleicos y péptidos. Recientemente, también se ha usado para la determinación de plaguicidas polares (Li, 2009; van Nuijs, 2011a).

Los primeros antecedentes sobre cromatografía HILIC se remontan a 1951, cuando se utilizó una capa enriquecida en H_2O sobre una superficie de resina de intercambio iónico (Gregor, 1951). Sin embargo, no fue hasta 1990 cuando el término HILIC se introdujo por primera vez (Alpert, 1990). Desde entonces, HILIC ha aumentado su popularidad, por ejemplo en la separación de fármacos polares y por la demanda creciente en el campo de la metabolómica, donde principalmente se analizan moléculas muy polares. Se pueden citar varios trabajos de revisión que tratan los fundamentos y aplicaciones de esta técnica con detalle (Bernal, 2011; Buszewski, 2012; Hemström, 2006; Kovaříková, 2011; Lämmerhofer, 2008; Lamouroux, 2011; van Nuijs, 2011a).

Por razones históricas, inicialmente se consideró que HILIC era una variante de NPLC, pero el mecanismo de separación usado en HILIC es más complicado. De modo similar a NPLC, en HILIC se pueden usar fases estacionarias polares tradicionales como silica, amino o ciano, pero, sin embargo, la fase móvil es similar a las empleadas en RPLC. Esta técnica también se ha descrito como una variante de RPLC, pero usando una fase estacionaria polar. Por este motivo, algunos autores la definen como “reversed reversed-phase”. La fase móvil utilizada suele ser un disolvente polar miscible con H₂O (generalmente ACN) con un pequeño porcentaje de H₂O. La fuerza eluotrópica de los disolventes más usados como fase móvil en HILIC se considera que varía del siguiente modo (Buszewski, 2012) :

acetona < isopropanol ~ propanol < acetonitrilo < etanol < dioxano < DMF ~ metanol < agua

Las separaciones se pueden llevar a cabo en modo isocrático, generalmente con un alto porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil, o con gradientes que comienzan con un alto porcentaje de disolvente orgánico y terminan con alto porcentaje de H₂O/tampón acuoso. Se cree que en HILIC el agua de la fase móvil forma una capa acuosa sobre la superficie polar de la fase estacionaria polar frente a una fase móvil deficiente en H₂O, creando un sistema de partición líquido-líquido.

Los analitos polares se particionan entre la capa acuosa y la fase estacionaria, con **mecanismos de retención** complejos que se atribuyen a una combinación de:

- Partición hidrofílica del analito entre la capa acuosa adsorbida sobre la superficie de la fase estacionaria y el disolvente usado como fase móvil
- Enlace de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales polares del analito y la fase estacionaria
- Interacciones electrostáticas sobre los grupos funcionales en forma iónica

Además, bajo ciertas condiciones experimentales también pueden estar presentes interacciones de Van der Waals entre las partes hidrofóbicas de ligandos unidos a la fase estacionaria y la parte no polar de los analitos **Figura 3.6** (Thermo, 2014).

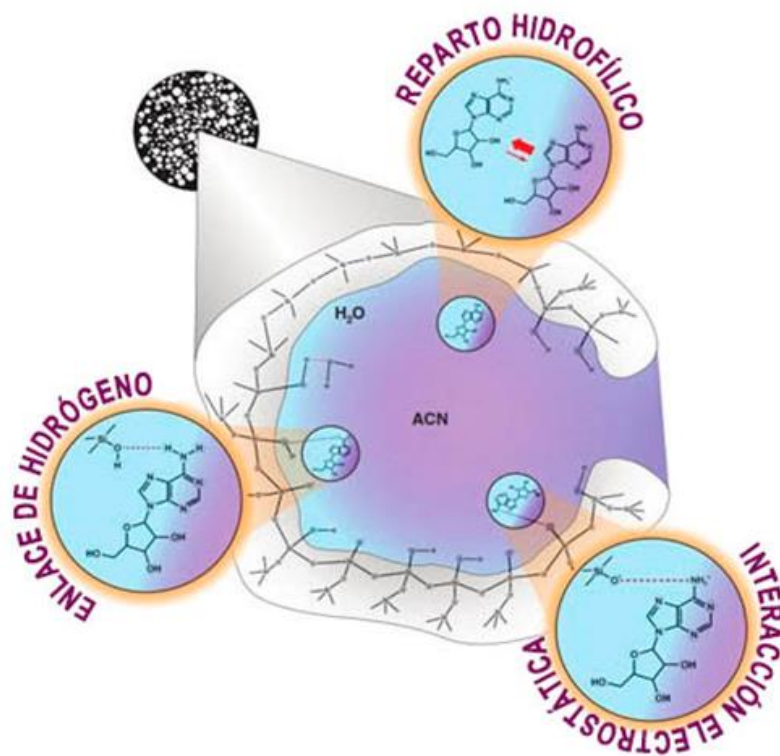


Figura 3.6 Interacciones de Van der Waals presentes en cromatografía HILIC (Thermo, 2014)

HILIC presenta varias ventajas sobre sistemas convencionales NPLC y RPLC: a) mayor retención de compuestos polares hidrofílicos que no son retenidos en condiciones normales mediante RPLC, sin la necesidad de aditivos formadores de pares iónicos en la fase móvil; b) adecuada para compuestos que eluyen cerca del volumen muerto en RPLC; c) las muestras/extractos polares muestran buena solubilidad en las fases móviles usadas en HILIC, lo cual supone una ventaja frente a la pobre solubilidad observada en NPLC; d) en general, se adapta mejor a los requisitos de espectrometría de masas, aportando mayor sensibilidad en la detección, especialmente cuando se trabaja en modo ESI. Esto es debido a los bajos porcentajes de H_2O en la fase móvil, con altos porcentajes de disolvente orgánico (generalmente ACN), lo que provoca una desolvatación más eficiente de los analitos. HILIC también permite el análisis de especies cargadas, al igual que en cromatografía iónica (IC). La

figura 3.7 Ilustra cómo HILIC se complementa con otros tipos de cromatografía, combinando las características de tres sistemas ampliamente usados en cromatografía líquida: NPLC, RPLC, IC.

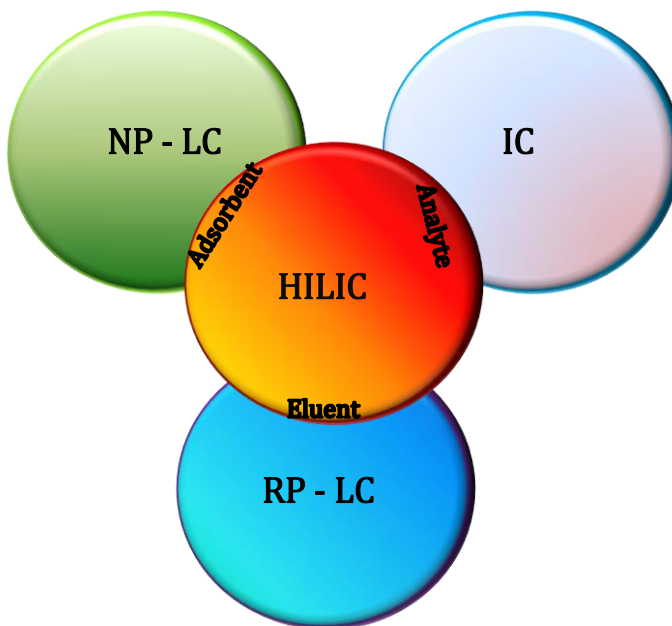


Figura 3.7 Combinación de los tres tipos de cromatografías que se complementan en HILIC (Buszewski, 2012).

En contraste con RPLC, el gradiente de elución en HILIC comienza con una baja polaridad en el disolvente orgánico (bajo porcentaje de H₂O) y los analitos polares eluyen al aumentar la polaridad de la fase móvil, es decir, al aumentar el contenido en fase acuosa. HILIC permite buenas separaciones para compuestos altamente polares que son poco retenidos en RPLC pero que tienen insuficiente carga para una retención efectiva de tipo electrostático en IC. En general, la eficacia en la separación de analitos polares en HILIC es mejor que en RPLC con fases móviles altamente acuosas (Buszewski, 2012).

Existen muchas fases estacionarias que se pueden usar en modo HILIC. En principio, se podría usar cualquier superficie cromatográfica polar, aunque las típicas fases estacionarias consisten en “classical bare” silica o geles de sílica modificados con diferentes grupos funcionales polares. También se pueden utilizar fases estacionarias tipo polimérico. Las fases

estacionarias usadas en HILIC se pueden dividir en tres grupos: neutras, cargadas y anfotéricas. Usando fases estacionarias neutras (ej. diol o amida) no se producen interacciones electrostáticas, mientras que con fases cargadas (ej. sílice o aminopropil) se producen fuertes interacciones electrostáticas entre los analitos cargados y la fase estacionaria. Con las fases anfotéricas (ej. sulfobetaine sílica) las interacciones electrostáticas con los analitos son débiles (Bernal, 2011).

En la presente Tesis Doctoral se estudió la separación cromatográfica del GLY mediante cromatografía HILIC y mediante fases estacionarias tipo *mix-mode*, ya que la retención en modo fase inversa se mostró claramente insuficiente. Se probaron cuatro columnas cromatográficas (BEH HILIC, BEH amide, Obelisc R y Obelisc N), cuyas características y mecanismos de separación se discuten brevemente a continuación.

- **BEH (Ethylene Bridged Hybrid) HILIC (Waters)**

La tecnología BEH se basa en el uso de partículas híbridas de sílice (orgánica/inorgánica) con puentes de etileno. En la síntesis de partículas de BEH se usa el monómero bis (triethoxysilil) etano, que contiene un puente de etileno en su estructura. Este puente de etileno confiere a la partícula de sílice resistencia frente a la disolución a pH elevados, característica de los polímeros, sin sacrificar la eficacia de las partículas de sílice en cuanto a la separación cromatográfica, al tiempo que le confiere mayor hidrofobicidad.

La columna BEH HILIC utiliza partículas BEH con puentes de etileno sin funcionalizar. Su uso está recomendado para mejorar la retención de analitos básicos muy polares que no tienen buena retención por RPLC. Además, presenta excelente estabilidad química en un amplio rango de pH y buena forma de pico, en comparación con las clásicas fases estacionarias HILIC basadas en sílica. En la **figura 3.8** se pueden apreciar los grupos funcionales de esta columna.

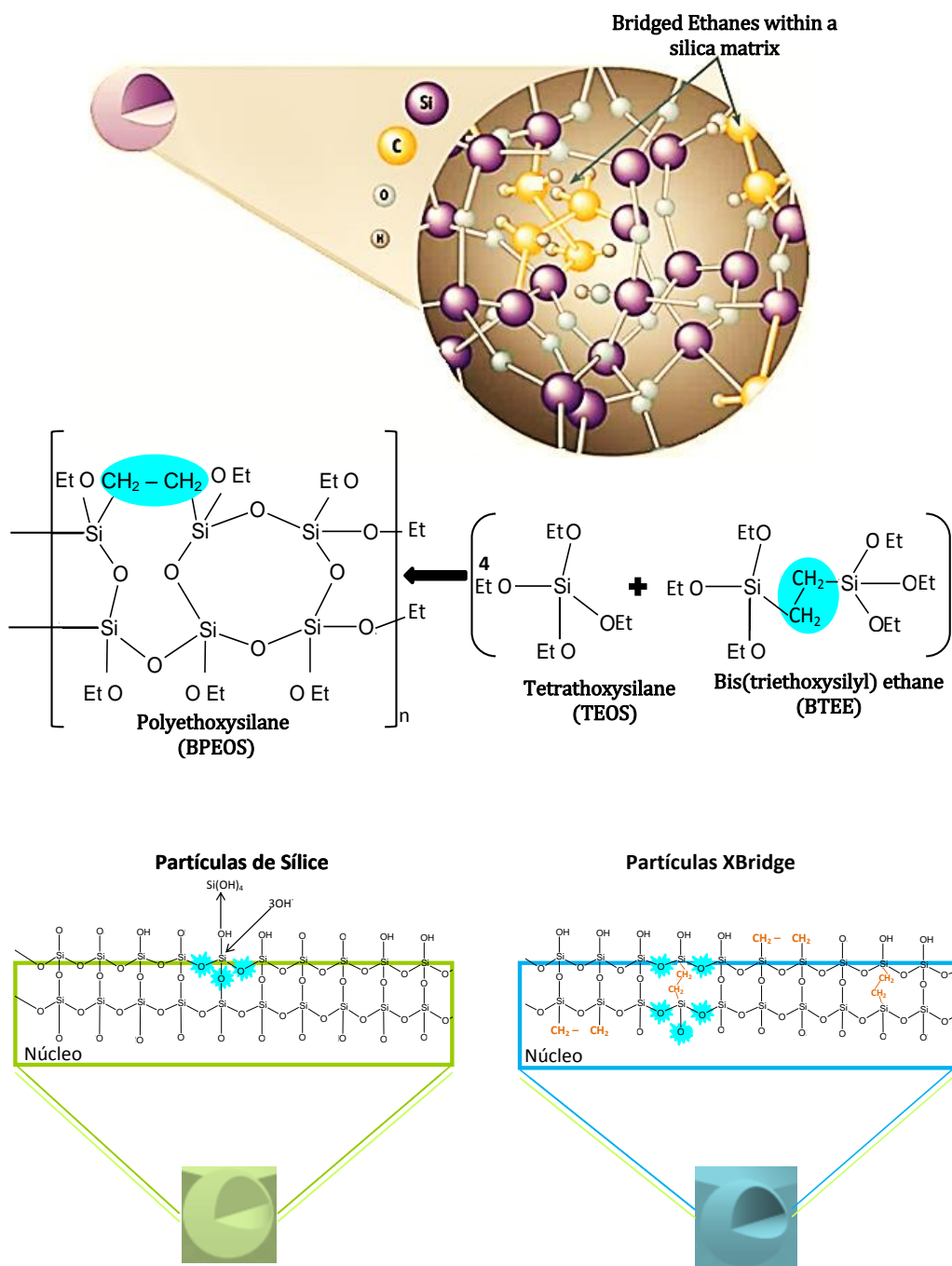


Figura 3.8 Grupos funcionales de la columna BEH HILIC (Waters, 2008)

BEH amide (Waters)

Las partículas son también de tipo BEH, pero en este caso está funcionalizada con grupos polares amida terminales. Las fases amida ofrecen una fuerte interacción mediante enlace de hidrógeno entre la fase estacionaria y los analitos (**figura 3.9**). Diseñada para la retención de analitos polares ácidos, neutros y básicos en un amplio rango de pH de la fase móvil (entre 2 y 11).

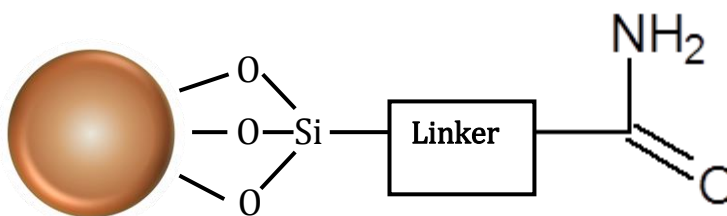


Figura 3.9 Grupo funcional de la columna BEH amide (BEH, 2012)

- Columnas modo-mixto Obelisc R y Obelisc N (SIELC)

En realidad, se trata de columnas con fase estacionaria en modo mixto (*mix-mode*) que, en principio, permiten un mayor rango de aplicaciones en comparación con las columnas de fase reversa o de intercambio iónico, permitiendo el análisis simultáneo de compuestos orgánicos e inorgánicos, polares y no polares, neutros o ionizables.

Estas columnas están basadas en la tecnología LiSC (*Living Separation Cell*), por sus similitudes con una célula viva. Se basa en una nueva modificación de los poros del gel de sílice que crea una celda de separación líquida con características de fuerza iónica, carga e hidrofóbicas que se mantienen en equilibrio constante con la fase móvil. Estas columnas ofrecen un nuevo enfoque para separar una amplia variedad de pequeñas moléculas. Los tres parámetros principales de la fase móvil que permiten el ajuste de las propiedades de la columna son la concentración de tampón, el pH del tampón y la concentración del modificador orgánico.

Las columnas Obelisc tienen una elevada densidad de iones positivos y negativos en la superficie de la fase estacionaria. Las cargas positivas y negativas en la superficie de la fase estacionaria están separadas por una larga cadena orgánica y permiten que tanto las cargas positivas como las negativas participen simultáneamente en la interacción electrostática.

Al disponer de dos cargas opuestas, las columnas Obelisc retienen compuestos polares sin el uso de reactivos de par iónico, y permiten el uso de una concentración de fase orgánica mucho mayor en la retención de compuestos polares que las columnas tradicionales de RPLC. Permiten múltiples modos de separación (RPLC, NPLC, HILIC, IC).

Obelisc R y Obelisc N se pueden considerar, en cierto modo, como complementarias, y difieren en el tipo y proximidad de sus grupos cargados y la hidrofobicidad de sus largas cadenas (**figura 3.10**).

Obelisc R es una columna con características de fase inversa. Tiene grupos catiónicos cerca de la superficie de la sílice separados de los grupos aniónicos por una **cadena hidrofóbica**. Está diseñada para la separación de moléculas polares y no polares pequeñas. Opera bajo múltiples modos de separación (RPLC, NPLC, IC).

Obelisc N tiene características de fase normal (NPLC). Tiene grupos aniónicos cerca de la superficie de la fase estacionaria separados de los grupos catiónicos por una **cadena hidrofílica**. Dispone, por tanto, de grupos ionizados positivamente o negativamente que pueden interactuar con analitos con grupos funcionales iónicos. Opera bajo múltiples modos de separación (NPLC, HILIC, IC). Según el fabricante, en modo HILIC ofrece una selectividad diferente a otras columnas HILIC o de sílice normal.

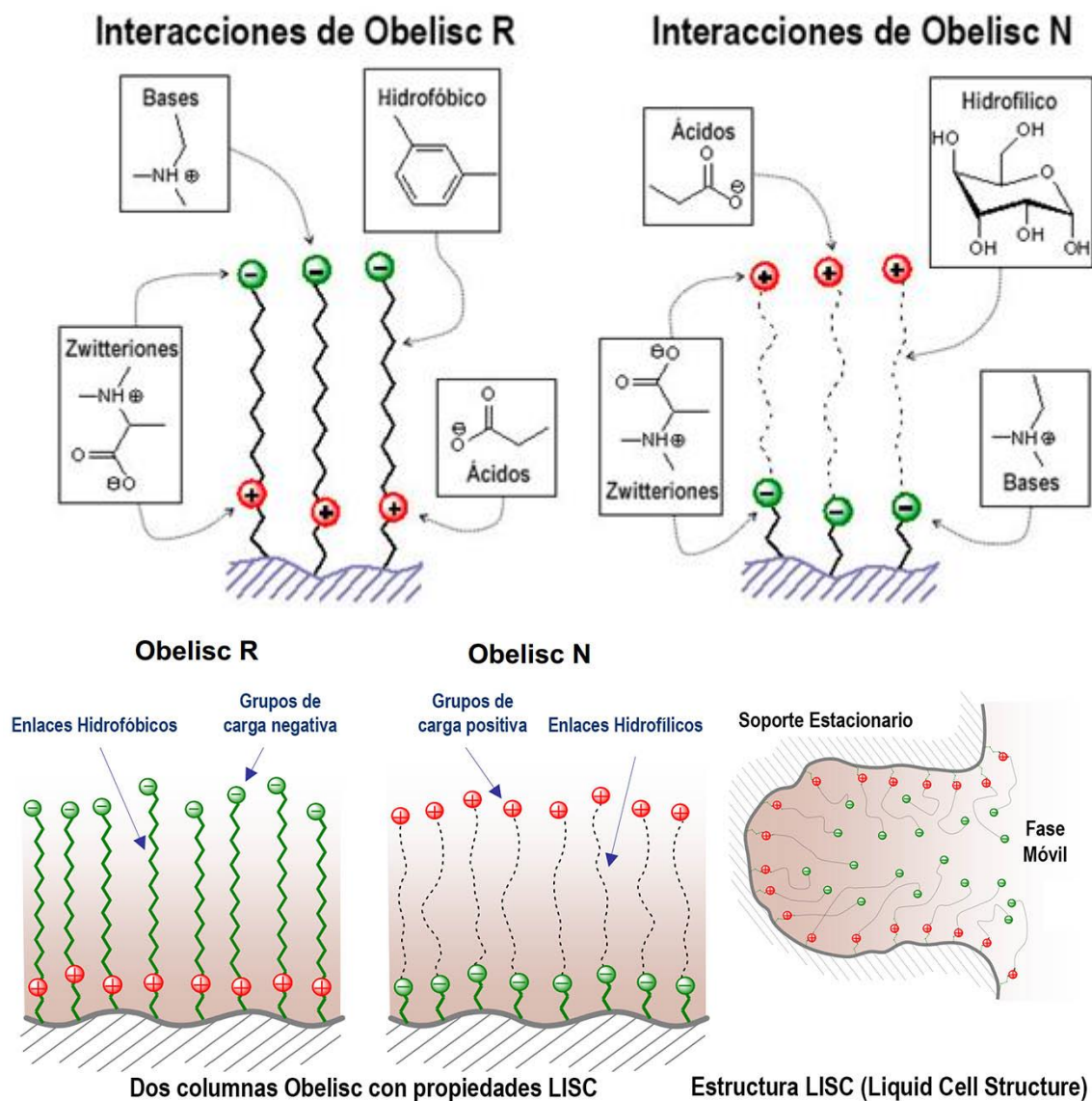


Figura 3.10 Tipos de interacciones de las fases estacionarias Obelisc con diferentes analitos (Obelisc, 2012).

Como se verá más adelante, en esta Tesis los mejores resultados se obtuvieron con la columna Obelisc N, que fue la finalmente seleccionada para el desarrollo del método.

En las **tablas 3.2a y 3.2 b** se muestra un resumen de los métodos de este tipo (determinación directa, sin derivatizar) publicados recientemente para GLY y/o AMPA.

A pesar de los muchos intentos por determinar el compuesto sin derivatizar, no parece haberse llegado a un método de consenso, suficientemente robusto, reproducible y confiable, obteniéndose en ocasiones poca retención del compuesto, malas formas de pico, o siendo necesaria una excesiva dilución de la muestra.

Los laboratorios de referencia de la Unión Europea para análisis de residuos de plaguicidas sugieren un método rápido para la determinación directa de GLY en frutas y verduras, usando cromatografía de intercambio aniónico, con una columna Dionex Ion Pac AS 11, acoplada a MS/MS en modo ESI negativo (Anastassiades, 2013). Sin embargo, no se encuentran apenas publicaciones científicas en las que se utilice esta metodología, tal vez porque el acoplamiento de cromatografía iónica (IC) con MS suele ser problemático por la incompatibilidad del tampón usado en la fase móvil en la determinación mediante MS. Parece ser que este método presenta dificultades de robustez y reproducibilidad y que, por ello, no tiene la aceptación que cabría esperar entre la comunidad químico-analítica.

De la bibliografía más reciente, se deduce que aunque existen varias publicaciones que reportan la determinación directa de GLY sin derivatización, no existe un sistema o método cromatográfico que esté ampliamente aceptado. El uso de columnas HILIC se presenta como una interesante alternativa, pero, de momento, no parece existir ninguna que sea de uso extendido y aceptado para GLY.

Analito	Matriz	Columnas	Fase Móvil	Técnica Utilizada	Límite Cuantificación LOQ mg/kg (s/n = 10)	Referencia
GLY - AMPA	Salvado, harina y grano de Trigo, cebada, avena, centeno	On-Line Clean-up C-1: PLRP-S (150 x 2.1 mm 100Å, 5µm) C-2: Shodex QA-824 (75 x 8mm) Intercambio aniónico.	H ₂ O: 2.5 mM H ₃ PO ₄ 7.5 mM HNO ₃ (Isocrático)	LC-MS/MS	GLY 0.1 AMPA 0.5	Granby, 2001
GLY	Salvado, harina y grano de Trigo, cebada, avena, centeno	On-Line Clean-up C-1: PLRP-S (150x2.1 mm 100Å, 5µm) C-2: Dionex Ion pac AS4A-SC (250 x 2mm) Intercambio aniónico.	H ₂ O: 30 mM NaHCO ₃ pH 8.2 (Isocrático)	LC-MS/MS	GLY 0.03	Granby, 2003
GLY - AMPA	Soja	Zorbax Eclipse RDB C8 (150 x 4.6 mm, 5µm)	A: H ₂ O 1.5 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ B: MeOH/H ₂ O 1.5 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ (Gradiente)	LC-MS/MS	GLY 0.3 AMPA 0.34	Martins, 2009
GLY - GLU Glufosinato	Agua, melón, espinacas, patatas, tomates, raíz de rábano	HILIC Venusil: (250 x 4.6 mm, 5 µm)	H ₂ O:ACN 99:1 (0.1% HCOOH) (Isocrático)	LC-MS/MS LC/UV	GLY 0.02 GLU 0.05 GLY 850 GLU 600	Li, 2009
GLY - AMPA GLU - MPPA Bialaphos	Suero Humano	Obelisc N (Sielc Technologies) (150 x 2.1 mm, 5 µm)	H ₂ O:ACN 80:20 (0.1% HCOOH) (Isocrático)	LC-MS/MS	GLY 0.09 AMPA 0.07 MPPA 0.04	Yoshioka, 2011

Tabla 3.2a Métodos usados para analizar GLY y su metabolito sin derivatizar en diferentes matrices ambientales y alimentarias.

Analito	Matriz	Columnas	Fase Móvil	Técnica Utilizada	Límite Cuantificación LOQ mg/kg (s/n =10)	Referencia
GLY – GLU AMPA	Agua potable, superficial y subterránea	Dionex Acclaim® WAX-1 (50 x 3 mm, 3 µm) Mix mode: reversed phase/weak anion-exchange	A: H ₂ O:MeOH 50:50 30 mM NH ₄ AC B: H ₂ O:MeOH 50:50 (Gradiente)	LC-MS/MS	GLY 4.0 GLU 5.0 µg/L AMPA 12	Hao, 2011
GLY – GLU AMPA MPPA N-acetyl-glufosinato	Cerveza, cebada, te y sus ingredientes	Dionex IonPac AS12A Intercambio aniónico	H ₂ O:ACN (0.2% HCOOH) 95:5 (Isocrático)	LC-MS/MS	10	Nagatomi, 2013
GLY – AMPA	Apio repollo, pepino, frijoles, patata, naranja, manzana, pera, espinaca, tomate.	Asahipak NH2P-50 4E (250 x 4.6 mm, 5 µm) HILIC Wax mode	H ₂ O:ACN 50:50 (0.1 mM NH ₄ OH) (Isocrático)	LC-MS/MS	5	Chen, 2013
GLY – AMPA	Agua, vegetación, suelos.	Clean up: Cartuchos IC-RP (fase reversa, intercambio catiónico) Precolumna: Bio-Rad Cation H.	H ₂ O:ACN 80:20 (0.1% HCOOH) (Isocrático)	LC-MS/MS		Marek, 2013
GLY – GLU AMPA MPPA N-acetyl-GLU	Alimentos	Dionex IonPac AS 11 (250 x 2 mm) Dionex IonPac AS 11-HC (250 x 2 mm) Anion-exchange Hypercarb (100 x 2.1 mm, 5 m) Carbon	H ₂ O: 1 mM C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O: 1 mM C ₆ H ₁₄ N ₃ O ₇ H ₂ O: 1% HCOOH + MeOH MeOH: 1% HCOOH (Gradie)	LC-MS/MS		Anastassiades, 2013 (EU)
GLY – AMPA	Frutas, vegetales Cereales, leche Riñon.	Flow Injection Analysis (FIA)	-----	LC-MS/MS		Mol, 2014

Tabla 3.2b Métodos usados para analizar GLY y su metabolito sin derivatizar en diferentes matrices ambientales y alimentarias.

En cuanto a la **toxicidad del glifosato**, la EPA (Agencia de Protección Ambiental), así como la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo clasifican como de baja toxicidad, incluyéndolo en la Clase III para exposiciones oral e inhalación en una escala de I (más tóxico) a IV (menos tóxico). La evaluación del riesgo para muchos usos registrados en alimentos realizada por la EPA concluyó que la exposición y el riesgo a través de la dieta son mínimos.

Sin embargo, a pesar de su aparente baja toxicidad, existe controversia sobre los efectos en la salud humana. Mientras algunos estudios afirman que no hay riesgo asociado concluyente a la exposición (Williams, 2000), otros argumentan lo contrario, afirmando que el herbicida puede alterar la estructura del ADN en células de mamíferos, causar toxicidad en las células humanas placentarias, actuar como disruptor endocrino y puede llegar a producir toxicidad *in vivo* en células humanas así como provocar muerte celular en el hígado (Gasnier, 2009; Richard, 2005; Romano, 2010, 2012).

En Colombia este compuesto es utilizado ampliamente para el programa de erradicación de cultivos ilícitos, que forma parte del conocido Plan Colombia. Hay sospechas de que el uso de este herbicida está provocando daños en la salud humana de los individuos expuestos a la fumigación de campos sembrados de coca y amapola. Parece ser que estas reacciones adversas en la salud de los campesinos disminuyen conforme estos habitan más lejos de los cultivos ilícitos que son rociados con el herbicida. Se han reportado diversos trastornos de la salud asociados a exposiciones a GLY (Grisales, 2010; Nivia, 2001).

En una reciente publicación de la Agencia de Investigación del Cáncer (IARC) se clasifica al GLY como probable carcinogénico en seres humanos (Grupo 2A). Se indica que existen evidencias limitadas sobre su carcinogenicidad en seres humanos para el linfoma no-Hodgkin, y que existe suficiente evidencia de que el GLY puede producir cáncer en animales de laboratorio. De igual forma, se indica que este herbicida podría causar daño en el ADN y los cromosomas de las células humanas. En un estudio realizado en poblaciones próximas a zonas en la que se aplicó GLY se reportaron incrementos en los marcadores sanguíneos de daño cromosómico (Guyton, 2015).

Este tipo de datos es preocupante, ya que este herbicida se utiliza ampliamente en todo el planeta, especialmente desde la implantación de cultivos genéticamente modificados. La existencia de amplísimas zonas de cultivos resistentes a GLY, hace que su uso haya aumentado

drásticamente, favoreciendo su presencia en el medio ambiente y en los alimentos, aunque generalmente a bajas concentraciones. A pesar de la controversia, la mayoría de datos indica que su toxicidad no es muy elevada. Sin embargo, no habría que olvidar que los surfactantes empleados para difundir el ingrediente activo sobre la superficie también pueden tener efectos tóxicos, en particular para la fauna acuática.

A pesar de que el GLY parece presentar menor riesgo ecotoxicológico que otros herbicidas, resulta necesario estudiar su presencia en el medio ambiente acuático, debido a su elevado uso. La falta general de datos sobre niveles de GLY en aguas y suelos, en comparación con otros herbicidas bien conocidos, como las triazinas, fenil y sulfonilureas, o uracilos, sobre los que existe mucha más información al respecto, es motivo de preocupación sobre todo en países del ámbito latinoamericano, en los que existen amplísimas áreas dedicadas al cultivo de variedades transgénicas de soja o maíz, resistentes al GLY. Aunque el uso de este herbicida en estas circunstancias es muy elevado, existen pocos programas eficaces de control en las aguas y suelos, y los datos sobre niveles de concentración son muy escasos.

----- 0 -----

La metodología analítica desarrollada en el IUPA para residuos de GLY en muestras ambientales dio buenos resultados en los suelos y aguas procedentes de España (Ibáñez, 2005, 2006). Sin embargo, en la presente Tesis se encontraron dificultades inesperadas en suelos de países latinoamericanos (especialmente Colombia), con elevada carga orgánica y características físico-químicas diferentes a los analizados hasta aquel momento en nuestro laboratorio. La mayor complejidad de estos suelos obligó a realizar un estudio analítico muy detallado, con el fin de encontrar una solución satisfactoria. Además de evaluar la eficiencia de la etapa de extracción (generalmente se lleva a cabo en medio alcalino, típicamente con hidróxido de potasio (KOH), fue necesario aplicar una etapa de purificación para reducir el fuerte ME observado y facilitar su correcta cuantificación a bajos niveles. La presencia de interferentes, que afectaban a las transiciones MS/MS seleccionadas, fue otro de los problemas observados, al cual se le prestó una especial atención en esta Tesis.

En este capítulo se presentan dos artículos científicos en los que se aborda la determinación de residuos de GLY en muestras de suelos latinoamericanos (artículo 4) y en cereales (artículo 5).

En el **primer artículo** presentado en este capítulo (**artículo científico 4**), el objetivo fue desarrollar un método rápido, robusto y mejorado para la determinación de GLY y AMPA en suelos de mayor complejidad, en el que se incluye una etapa adicional de clean up, realizando los análisis mediante LC-MS/MS previa derivatización con FMOC. Los suelos estudiados fueron tomados de Colombia y de Argentina, países en los que este herbicida es utilizado ampliamente.

En Colombia el GLY es comercializado como Roundup®, formulado como sal isopropilamina (IPA), y es usado para el manejo de malezas en sistemas agrícolas, como los cultivos de algodón, arroz, banano, café, palma africana, papa, algunos frutales, cereales (maíz, soja, cebada) y cacao entre otros. En caña de azúcar se utiliza como madurador de la cosecha, inhibiendo la elongación de tallos y favoreciendo la acumulación del azúcar. También se usa como desecante en sorgo y otros cultivos, como regulador de crecimiento de las plantas, y en la erradicación de cultivos ilícitos (plantaciones de coca) por medio de aspersión aérea (Bustos, 2012).

En Argentina, existen amplias zonas dedicadas al cultivo de transgénicos, resistentes al GLY, siendo el tercer productor mundial, con 24.3 millones de hectáreas dedicadas a la siembra de soja, maíz y algodón, que representan tres cuartas partes de la tierra cultivada (Aparicio, 2013). Estos cultivos, especialmente la soja transgénica, que representa el 100% de la soja cultivada en la Argentina, fueron implementados en los años noventa y en apenas cinco años duplicaron su producción. En 2008, se alcanzaron 10 millones de hectáreas sembradas de soja transgénica por medio de la siembra directa (Peruzzo, 2008).

El aumento de las variedades de semillas genéticamente modificadas (GM), comercializadas como Roundup Ready (RR), ha conllevado un incremento en el consumo de GLY, tanto en su frecuencia de uso como en la cantidad (Riley, 2011). Se ha criticado la excesiva dependencia al GLY que sufre Argentina, motivada por la expansión de la soja GM RR, que en el año 2009 ocupaba 19 millones de hectáreas, más de la mitad del terreno cultivado del país. Se ha estimado en unos 200 millones de litros las formulaciones con GLY usadas cada año para producir 50 millones de toneladas de soja (Antoniou, 2010).

La excesiva aplicación de este herbicida puede llegar a ser problemática. Desde la introducción de los cultivos transgénicos RR, ha habido un drástico incremento en especies

de malezas que exhiben resistencia a este compuesto, principalmente en Latinoamérica, donde ya ha sido confirmado en más de 20 especies, con más de 100 cepas resistentes identificadas. A medida que la maleza gana resistencia al GLY, con el tiempo se requiere más cantidad de herbicida para su control. Se puede llegar a un punto en que el GLY ya no es eficaz, sea cual sea la cantidad que se administra, con lo que algunos agricultores se pueden ver obligados a volver a utilizar antiguos herbicidas más tóxicos y persistentes, como el 2,4-D entre otros (Annett, 2014; Green, 2014; Pispini, 2014).

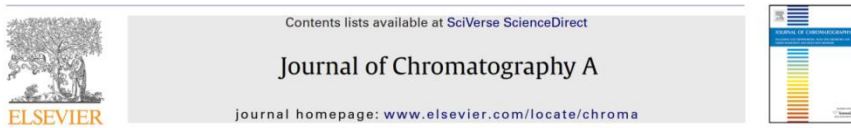
En el **segundo artículo** de este capítulo (**artículo científico 5**) se desarrolló metodología analítica para la determinación de residuos de GLY en cereales y soja. En esta ocasión, el objetivo principal fue evitar la etapa de derivatización, intentando la determinación directa del herbicida. Para ello, se probaron diferentes columnas de LC, seleccionando finalmente la *mix-mode* Obelisc N para el desarrollo del método, pues fue la que proporcionó mejor retención para el GLY. Las matrices objeto de estudio se seleccionaron entre las de mayor preocupación por la posible presencia de este compuesto (arroz, soja y maíz), tres cultivos que además se encuentran entre los de mayor uso en transgénicos resistentes al GLY. Aunque en esta Tesis no se estudió la problemática de los transgénicos, la presencia de residuos de GLY es más previsible en estos cultivos por la mayor utilización de este herbicida. Una vez validado el método, se aplicó a otras muestras vegetales, como se mencionará más adelante.

3.2.1. Artículo Científico 4

Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*
Journal of Chromatography A.1292 (2013) 132-141.

Journal of Chromatography A, 1292 (2013) 132–141



Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón 12071, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 13 December 2012

Keywords:
Glyphosate
AMPA
Latin-American soils
UHPLC–MS/MS
Clean-up
FMOC derivatization
Matrix effects
QTOF MS
Confirmation

ABSTRACT

The determination of glyphosate (GLY) in soils is of great interest due to the widespread use of this herbicide and the need of assessing its impact on the soil/water environment. However, its residue determination is very problematic especially in soils with high organic matter content, where strong interferences are normally observed, and because of the particular physico-chemical characteristics of this polar/ionic herbicide. In the present work, we have improved previous LC–MS/MS analytical methodology reported for GLY and its main metabolite AMPA in order to be applied to “difficult” soils, like those commonly found in South-America, where this herbicide is extensively used in large areas devoted to soya or maize, among other crops. The method is based on derivatization with FMOC followed by LC–MS/MS analysis, using triple quadrupole. After extraction with potassium hydroxide, a combination of extract dilution, adjustment to appropriate pH, and solid phase extraction (SPE) clean-up was applied to minimize the strong interferences observed. Despite the clean-up performed, the use of isotope labelled glyphosate as internal standard (ILIS) was necessary for the correction of matrix effects and to compensate for any error occurring during sample processing. The analytical methodology was satisfactorily validated in four soils from Colombia and Argentina fortified at 0.5 and 5 mg/kg. In contrast to most LC–MS/MS methods, where the acquisition of two transitions is recommended, monitoring all available transitions was required for confirmation of positive samples, as some of them were interfered by unknown soil components. This was observed not only for GLY and AMPA but also for the ILIS. Analysis by QTOF MS was useful to confirm the presence of interferent compounds that shared the same nominal mass of analytes as well as some of their main product ions. Therefore, the selection of specific transitions was crucial to avoid interferences. The methodology developed was applied to the analysis of 26 soils from different areas of Colombia and Argentina, and the method robustness was demonstrated by analysis of quality control samples along 4 months.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] (GLY) is a broad spectrum, non-selective post-emergence herbicide widely used around the world for weed and vegetation control. When this herbicide reaches the soil, it is strongly sorbed to soil components, such as clay, iron oxides, or humic substances [1–3]. Its degradation in the soil-environment mainly occurs under biological conditions yielding aminomethylphosphonic acid (AMPA) as the major metabolite [4–6]. Although GLY would not be expected to be transported to ground and surface water, due to its strong sorption onto the soil and its microbiological degradation, both GLY and AMPA have been found in natural waters [7–9]. The urban contribution

of GLY and AMPA to wastewaters has also been reported [10], as well as the presence of substantial amounts in sewage sludge from urban areas [11].

Although glyphosate has lower ecotoxicological potential than many other herbicides, a thorough assessment of its environmental occurrence is necessary given to its worldwide application. This is of special relevance in countries like Argentina, where huge areas are devoted to transgenic varieties of glyphosate tolerant soybean [12], or like Colombia, where this herbicide is also widely used in agriculture. The environmental fate and behaviour of glyphosate is subjected to controversial. One of the main problems comes from its difficult determination in soil and water samples. Its amphoteric and highly polar character [13] makes its residue determination an analytical challenge, particularly in soil samples with high organic matter content, due to their higher complexity and likely presence of interferent compounds.

Most methods reported for GLY and AMPA are troublesome, with tedious sample preparation, and a derivatization step is

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@uji.es (F. Hernández).

Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry

J. Chromatogr. A, (2013) 1292: 132–141

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellon 12071, Spain

ABSTRACT

The determination of glyphosate (GLY) in soils is of great interest due to the widespread use of this herbicide and the need of assessing its impact on the soil/water environment. However, its residue determination is very problematic especially in soils with high organic matter content, where strong interferences are normally observed, and because of the particular physico-chemical characteristics of this polar/ionic herbicide. In the present work, we have improved previous LC–MS/MS analytical methodology reported for GLY and its main metabolite AMPA in order to be applied to “difficult” soils, like those commonly found in South-America, where this herbicide is extensively used in large areas devoted to soya or maize, among other crops. The method is based on derivatization with FMOC followed by LC–MS/MS analysis, using triple quadrupole. After extraction with potassium hydroxide, a combination of extract dilution, adjustment to appropriate pH, and solid phase extraction (SPE) clean-up was applied to minimize the strong interferences observed. Despite the clean-up performed, the use of isotope labelled glyphosate as internal standard (ILIS) was necessary for the correction of matrix effects and to compensate for any error occurring during sample processing. The analytical methodology was satisfactorily validated in four soils from Colombia and Argentina fortified at 0.5 and 5 mg/kg. In contrast to most LC–MS/MS methods, where the acquisition of two transitions is recommended, monitoring all available transitions was required for confirmation of positive samples, as some of them were interfered by unknown soil components. This was observed not only for GLY and AMPA but also for the ILIS. Analysis by QTOF MS was useful to confirm the presence of interferent compounds that shared the same nominal mass of analytes as well as some of their main product ions. Therefore, the selection of specific transitions was crucial to avoid

interferences. The methodology developed was applied to the analysis of 26 soils from different areas of Colombia and Argentina, and the method robustness was demonstrated by analysis of quality control samples along 4 months.

Keywords: Glyphosate, AMPA, Latin-American soils, UHPLC-MS/MS, clean-up, FMOc derivatization, matrix effects, QTOF MS, confirmation.

INTRODUCTION

Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] (GLY) is a broad spectrum, non-selective post-emergence herbicide widely used around the world for weed and vegetation control. When this herbicide reaches the soil, it is strongly sorbed to soil components, such as clay, iron oxides, or humic substances [1–3]. Its degradation in the soil-environment mainly occurs under biological conditions yielding aminomethylphosphonic acid (AMPA) as the major metabolite [4–6]. Although GLY would not be expected to be transported to ground and surface water, due to its strong sorption onto the soil and its microbiological degradation, both GLY and AMPA have been found in natural waters [7–9]. The urban contribution of GLY and AMPA to wastewaters has also been reported [10], as well as the presence of substantial amounts in sewage sludge from urban areas [11].

Although glyphosate has lower ecotoxicological potential than many other herbicides, a thorough assessment of its environmental occurrence is necessary given to its worldwide application. This is of special relevance in countries like Argentina, where huge areas are devoted to transgenic varieties of glyphosate tolerant soybean [12], or like Colombia, where this herbicide is also widely used in agriculture. The environmental fate and behaviour of glyphosate is subjected to controversial. One of the main problems comes from its difficult determination in soil and water samples. Its amphoteric and highly polar character [13] makes its residue determination an analytical challenge, particularly in soil samples with high organic matter content, due to their higher complexity and likely presence of interferent compounds.

Most methods reported for GLY and AMPA are troublesome, with tedious sample preparation, and a derivatization step is normally required for its appropriate chromatographic

determination. The wide majority of early methods made use of a derivatization step with fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) to produce a fluorescent derivative. The use of coupled-column liquid chromatography (LC-LC) with fluorescence detection allowed in the 90s to reach the sensitivity and selectivity required for GLY residue determination in water [14,15], soil [16] and vegetable products [17]. Although this approach was an important advance, the irruption and instrumental developments of LC coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has allowed renewing and improving the previous methodology based on the use of conventional detection systems. However, even using LC-MS/MS, the derivatization of GLY and AMPA is normally required to reach sufficient retention into the reversed-phase chromatographic columns commonly used and/or for analyte pre-concentration in most chromatographic sorbents. In the last years several papers have been published on GLY and AMPA determination in environmental samples, mainly soil and water, making use of LC-MS, or LC-MS/MS, previous derivatization with FMOC [8,9,18–20]. This technique has also been used for their determination in sewage sludge after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support [21]. Due to the high complexity of the samples, purification on SAX resin was firstly required followed by a pre-concentration of the derivatized analytes on SPE Oasis HLB cartridges. Although a few methods have recently reported the direct determination of GLY (i.e. without derivatization) in environmental, food and biological matrices, using HILIC columns, designed for very polar analytes [22,23], anion-exchange [24] or even reversed-phase columns [25], however there is not yet a methodology widely accepted using this type of columns, and more research is required to demonstrate the robustness when applied to complex-matrix samples.

From our first works on GLY residue analysis based on LC-LC/FD [14–17], we moved to LC-MS/MS, which was successfully applied to water and soil samples from Spain [8,9]. However, some difficulties were found when we analyzed soils collected from South America, most of them characterized by high organic matter content. Severe matrix effects and poor reproducible data were observed, which encouraged us to update the analytical methodology for this type of samples. In the present work, a detailed study has been made on the analytical determination of GLY and AMPA residues in “difficult” soil matrices, making use of LC-MS/MS with triple quadrupole. After soil extraction with KOH, the need of performing an efficient clean-up (either before or after derivatisation) has been evaluated. Several possibilities were tested in order to find the best option in terms of sensitivity,

matrix effects and robustness. Special attention has been paid to the presence of matrix components that affect not only the ionization of analytes but also interfere the MS/MS transitions monitored. To this aim, LC-QTOF MS has been a valuable tool thanks to the accurate-mass full-spectrum acquisition data provided by this technique.

EXPERIMENTAL

Reagents and chemicals

Glyphosate (98%) and AMPA (99%) reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and Sigma (St. Louis, MO, USA), respectively. Isotope-labelled glyphosate ($1,2^{13}\text{C}$, ^{15}N), used as internal standard (IS), was purchased from Dr. Ehrenstorfer. Analytical reagent-grade disodium tetraborate decahydrate was obtained from Scharlab (Barcelona, Spain) and 9-fluorenmethylchloroformate (FMOC-Cl) was purchased from Sigma. Reagent-grade hydrochloric acid, formic acid, potassium hydroxide (KOH), acetic acid (HAc) and ammonium acetate (NH_4Ac) as well as LC-grade acetonitrile were purchased from Scharlab. HPLC-grade water was obtained by water passed through a MilliQ water purification system (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA).

Standard stock solutions were prepared dissolving approximately 50 mg powder, accurately weighted, in 100 mL of water obtaining a final concentration of approximately 500 mg/L. A 50-mg/L composite standard was prepared in water by mixing and diluting the individual standard stock solutions. Standard mixed working solutions for LC-MS/MS analysis and for samples fortification were prepared by dilution of the 50-mg/L composite standard with water.

The isotope-labelled glyphosate used as internal standard (ILIS) was purchased as 1.1 mL of 100 $\mu\text{g/mL}$ stock solution in water. A 11 $\mu\text{g/mL}$ ILIS solution was prepared by dissolving 1.1mL of the stock solution in 10 mL of water. ILIS working solutions were prepared by diluting the intermediate standard solution with water.

Solutions of 5% (w/v) borate buffer (pH approximately 9) in HPLC-grade water and 12.000 mg/L of FMOC-Cl in acetonitrile were used for the derivatization step. OASIS HLB cartridges

(60 mg) as well as OASIS MAX cartridges (60 mg) were purchased from Waters (Mildford, MA, USA). 0.45m nylon filters were purchased from Scharlab.

Instrumentation

Ultra-performance liquid chromatography (UPLCTM) system Acquity (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer (TQD, Waters Micromass, Manchester, UK) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface. The LC separation was performed using a Discovery analytical column C18, 5 μ m particle size 50 mm \times 2.0 mm i.d. (Supelco, Bellefonte, PA, USA), at a flow rate of 300 μ L/min. Mobile phase was a time-programmed gradient using A (H₂O 5mM acetic acid/ammonium acetate, pH 4.8) and B (acetonitrile). The percentage of organic modifier (B) was changed linearly as follows: 0 min, 10%; 2.5 min, 10%; 2.6 min, 90%; 4.6 min, 90%; 4.7 min, 10%; and 10 min, 10%. The injection volume was 20 L. Drying as well as nebulizing gas was nitrogen, obtained from a nitrogen generator. The gas flow was set to 1200 L/h. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately 4.10⁻³ mbar in the collision cell. Experiments were performed in positive ionization. A capillary voltage of 3.5 kV was applied. The desolvation gas temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Temperature column was set to 40°C. Dwell times of 0.20 s/scan were chosen. MassLynx v 4.1 (Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

Waters Acquity UPLC (Waters) was interfaced to a hybrid quadrupole-orthogonal acceleration-TOF mass spectrometer (Q-TOF Premier, Waters Micromass), using an orthogonal Z-spray-ESI interface. TOF-MS resolution was approximately 10,000 at full width half maximum (FWHM) at m/z 556.2771. LC conditions were the same indicated above. Capillary voltage of 3.5 kV and cone voltage of 25 V was used. For MS/MS experiments, collision energy of 10eV was selected. For automated accurate mass measurement, the lock-spray probe was used, using as lockmass leucine enkephalin (2 μ g/mL) in acetonitrile:water (50:50) at 0.1% HCOOH.

Recommended procedure

The procedure was based on the previously reported [8], although including a clean-up step consisting on a first dilution of the sample extract, an adjustment of the pH to 9 and an SPE step using Oasis HLB cartridges. The procedure applied was as follows: 2.0 g soil sample (previously dried at room temperatures and homogenized) was weighted into a 50-mL centrifuge tube. The sample was extracted with 10 mL 0.6 M KOH on a mechanical shaker for 30 min, and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Then, 1 mL of the supernatant was diluted with 1 mL HPLC-grade water into a glass tube, and 200 µL of the isotope labelled internal standard (ILIS) (1.10 mg/L) was added. The soil extract was adjusted to pH 9 by adding HCl 6M and/or 0.6M, and it was loaded onto a OASIS HLB cartridge (60 mg), previously conditioned by passing 2 mL methanol and 2 mL water at pH 9. The non-retained sample extract was collected and derivatized with 120 µL borate buffer and 120 µL of FMOC-Cl reagent. The tube was swirled and left overnight at room temperature (between 12 and 15 h). After that, the derivatized extracts were filtered through a 0.45 µm nylon filter and acidified with HCl (c) to pH 1.5 and let stand for 1 h. Then, it was centrifuged, and 20 µL of the final extract was injected into the LC-ESI-MS/MS system under the chromatographic and MS conditions indicated in instrumentation and Table 1, respectively. A scheme of the procedure applied is depicted in Fig. 1 (procedure B).

Validation study

Validation of the method was based on European Union SANCO guidelines [26,27]. Precision (repeatability, in terms of % RSD) and accuracy (percentage recoveries) were estimated by recovery experiments in four selected soils (two from Argentina and two from Colombia), at two fortification levels each (0.5 and 5 mg/kg), and analyzed in quintuplicate. Non-spiked soils were also analyzed in duplicate to obtain the concentrations of GLY and AMPA in the “blank” samples. Recoveries between 70%-120%, with RSD lower than 20%, were considered as satisfactory.

Linearity of the method was evaluated analysing five standard solutions, in duplicate, in the range of 5–2500 µg/L. Linearity was considered satisfactory when correlation coefficient was higher than 0.99 and residuals lower than ±20%.

Table 1 Optimized 1 MS/MS parameters for GLY, AMPA and ILIS.

COMPOUND	PRECURSOR ION	PRODUCT ION	Q/q ratio **	CONE VOLTAGE (V)	COLLISION ENERGY (eV)
GLY-FMOC	392.3	Q 88.0	--	20	25
		q ₁ 170.0	2.66		15
		q ₂ 179.3*	2.25		20
		q ₃ 214.1	1.87		10
AMPA-FMOC	334.2	Q 179.2*	--	20	25
		q ₁ 112.0	2.59		15
ILIS-FMOC	395.3	Q 91.0	--	20	25
		q ₁ 173.0*	--		15
		q ₂ 179.3*	--		20
		q ₃ 217.1*	--		10

* Transitions interfered in several of the soils tested.

** Average value for standards used in the calibration curves.

The specificity of the method was evaluated by analysing a procedure blank, a processed “blank” soil, and a processed “blank” soil spiked at the lowest concentration level tested. Due to the presence of both GLY and AMPA in the soils used in validation experiments, the most common approach, e.g. absence of chromatographic peaks at the MS/MS transitions monitored, could not be applied. Instead, a detailed study on several soils by monitoring all available transitions was made together with QTOF MS analysis to evaluate the possible presence of matrix interferences making use of the accurate- mass full-acquisition data generated.

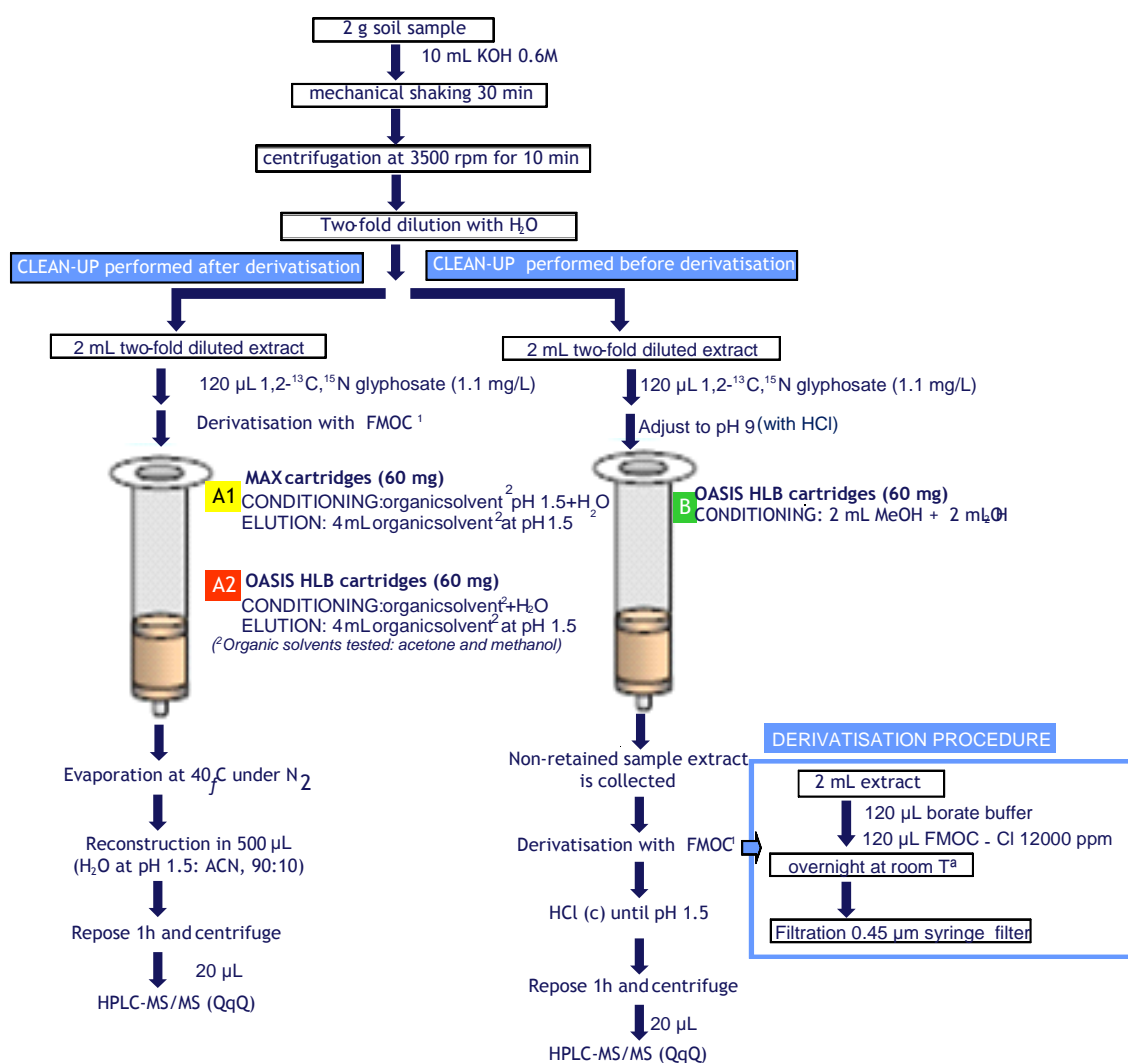


Fig. 1. Clean-up procedures assayed in this work: (a) Clean-up performed after FMOCl derivatisation; (b) clean-up performed before FMOCl derivatisation (recommended procedure).

The limit of quantification (LOQ) was estimated for a signal-to-noise ratio of 10 from the chromatograms of samples spiked at the lowest concentration validated (i.e. 0.5 mg/kg), making use of the quantification transition (Q). The limit of detection (LOD) was estimated similarly to the LOQ but for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms of samples spiked at the lowest concentration validated.

Confirmation of the identity of the compound in samples was carried out by acquisition of four (GLY) and two (AMPA) MS/MS available transitions, and the compliance of at least one Q/q ratio when compared with reference standards (Q, quantification transition; q, confirmation transition). Maximum deviations accepted in Q/q ratios were based on guideline SANCO/10684/2009 [26] as well as on European Decision 2002/657 [28] and varied between 10% and 50% depending on the Q/q ratio value. The agreement in retention time between standards and samples was also required, with maximum deviation of 2.5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Experiments for method development, optimization and validation were carried out on several soils collected in Colombia and Argentina from agricultural areas where glyphosate is widely used. Around 1 kg soil sample was collected and dried at room temperature during at least 4 days. Then, it was homogenized and passed through a 1-mm sieve. An aliquot of around 25 g was introduced in 50-mL polyethylene tubes and transported to Spain, within 48 h. Five out of the six soils had acidic pH, around 4.2–4.5, and organic matter was above 3% in three of them. Physicochemical properties and the classification of these soils are shown in Supplementary Information (Table S1, SI).

Analysis of these soils using the methodology previously developed for GLY [8] showed strong matrix effect and, in general, unsatisfactory correction using isotope-labelled glyphosate as ILIS. Poor reproducibility was also observed together with notable interferences. Therefore, in this paper we focused our work on the clean-up of the soil extracts in order to minimize matrix interferences. A detailed study of interferent compounds that might affect analytes quantification and confirmation was also made. Alkaline extraction with KOH was selected, as both NaOH and KOH have been widely applied for GLY extraction in soils, sediments and sewage sludge [8,11,16,21,29,30]. As regards the derivatization

reaction, it was applied as in our previous work [8]. Although some authors reported low reaction kinetic and yield under low acetonitrile content [31], we did not observed significant problems when performing the derivatization under the conditions tested when performing the derivatization overnight (final ACN content around 5%). A filtration was required after derivatization (see recommended procedure and Fig. 1), surely as a consequence of the low solubility of FMOC in water, but it seemed not to much affect the efficiency or reproducibility of the derivatization.

LC-MS/MS conditions: study of matrix interferences

Initial conditions regarding derivatization, chromatographic and MS/MS conditions were taken from our earlier works [8].

Working under positive mode, two transitions for AMPA-FMOC and four transitions for GLY-FMOC were selected (Table 1). Regarding ILIS-FMOC, four transitions were also available, similarly to GLY-FMOC. Special attention was paid to the selectivity of these transitions, as our preliminary data in selected soils showed that some transitions were shared by unknown matrix components. This situation would make unfeasible the confirmation of positives, as Q/q ratios would not fit with reference standards, and might also affect the quantification (e.g. an interference in the Q transition would lead errors by excess). It is worth to notice that after derivatization with FMOC, application of a highly selective technique as LC-MS/MS, and even after applying a clean-up step (as demonstrated subsequently in this work), one of the GLY transitions (392 > 179, named as q2) and one of the AMPA transitions (334 > 179, named as Q) were frequently interfered, especially in the soils from Colombia. In addition, up to three transitions selected for the ILIS were also shared by soil matrix components (395 > 173 (q1), 395 > 179 (q2), 395 > 217 (q3)). The latter would only affect the confirmation of ILIS in the samples, which seems unnecessary as the objective of ILIS is to facilitate matrix effect correction, and to this aim only the quantification transition is required (to obtain the relative areas analyte/ILIS). However, this situation illustrates that occurrence of interferences in the LC-MS/MS determination of glyphosate in soils is more likely than expected, and the analyst must be aware of this possibility to avoid unexpected problems.

At this point, UHPLC-QTOF experiments were performed to obtain more information on the

interferences observed. Next, the ILIS interference is discussed as illustrative example. The accurate mass of the protonated molecule of this unknown was found to be m/z 395.1624, which differed 69.8 mDa from the exact mass of the ILIS-FMOC (**see Fig. 2**). The MS/MS spectrum of this compound presented product ions at m/z 217.0860, 179.0874, 173.0937, 116.0735 and 70.0659 (**Fig. 2, bottom**). Product ions at m/z 217, 179 and 173 (in nominal mass) also appeared in the MS/MS spectra of ILIS-FMOC (**Fig. 2, top**), which explain the interference observed.

Moreover, the product ion m/z 179 had the same exact mass than that of ILIS-FMOC, and corresponded to $C_{14}H_{11}$ (m/z 179.0861) generated from FMOC reagent. A CO_2 loss ($217 \rightarrow 173$) was also observed in both spectra. Comparing both MS/MS spectra, it seems that the unknown compound was a primary or secondary amine, which was also derivatised with FMOC. Similarly to the ILIS-FMOC spectrum, where the ion at m/z 173 corresponds to the protonated molecule of ILIS, the ion at m/z 173.0937 in the interference-FMOC spectrum should correspond to the protonated molecule of the interference.

An attempt to elucidate this unknown was made following the strategy previously reported [32]. Possible elemental compositions for m/z 173.0937, with a maximum deviation of 3 mDa from the measured mass, were calculated using the elemental composition program within the MassLynx software. A minimum of 1N, 4C and 8H atoms were considered taking into account the general structure depicted in **Fig. 2** for this ion as well as the product ion at m/z 70.0659 (C_4H_8N as the only possibility).

Three plausible elemental compositions were finally suggested for m/z 173.0937: $C_4H_{14}N_2O_4F$, $C_5H_{10}N_6F$ and $C_6H_{14}N_4P$ (expressed as protonated molecule). After searching in Chemical databases (Reaxys and ChemSpider), no hits were found for $C_4H_{13}N_2O_4F$ and $C_5H_9N_6F$. The formula $C_6H_{13}N_4P$ resulted in one, but none chemical structure supported by the fragment ions observed could be finally proposed (**more details in Supplementary Information**).

It is noteworthy that those transitions including the product ion m/z 179 were interfered in several of the soils analyzed for GLY and AMPA, and also for ILIS (**Table 1**). Interestingly, this product ion comes from FMOC (**see Fig. 2**) and consequently it has no relationship with the chemical structure of the analytes. Therefore, the specificity of the transitions needs to

be taken into account, and one should avoid those transitions resulting from non-selective losses, e.g. water, CO₂, HCl, or in this case the derivatized reagent FMOC [33]. The interference occasionally observed for GLY-FMOC (transition named as q2) was not much problem for confirmation of GLY as there were another two confirmation transitions available. On the contrary, the confirmation of AMPA was problematic in several soils, as one out of two available transitions was frequently interfered (334 → 179), and no more options existed for confirmation based on Q/q ratio tolerances, as discussed in the following sections.

Under these circumstances, the acquisition of all available transitions (instead of only two, which is the most usual approach in the literature), seems the best option to have more possibilities to find non-interfered transitions for analysis of GLY and AMPA in soils.

Clean-up study

Several approaches were tested on soil alkaline extracts in order to minimize the strong matrix effects observed: dilution of the extract with water, modification of pH, and application of SPE clean-up step. As shown in this section, a combination of the three factors was found the most appropriate to this aim. The clean-up procedures tested in this work are schematically shown in Fig. 1.

Procedure A consisted on performing the SPE clean-up after derivatization with FMOC. The objective was to retain the FMOC- derivative in the cartridge, while it was expected that interfering matrix components would pass the cartridge as unretained compounds, or would not be eluted with the eluting solvent used for analytes. Two different cartridges were tested: Oasis MAX, designed to achieve higher selectivity and sensitivity for extracting acidic compounds with anion-exchange groups, and Oasis HLB, an universal polymeric reversed-phase sorbent developed for the extraction of a wide range of acidic, basic, and neutral compounds.

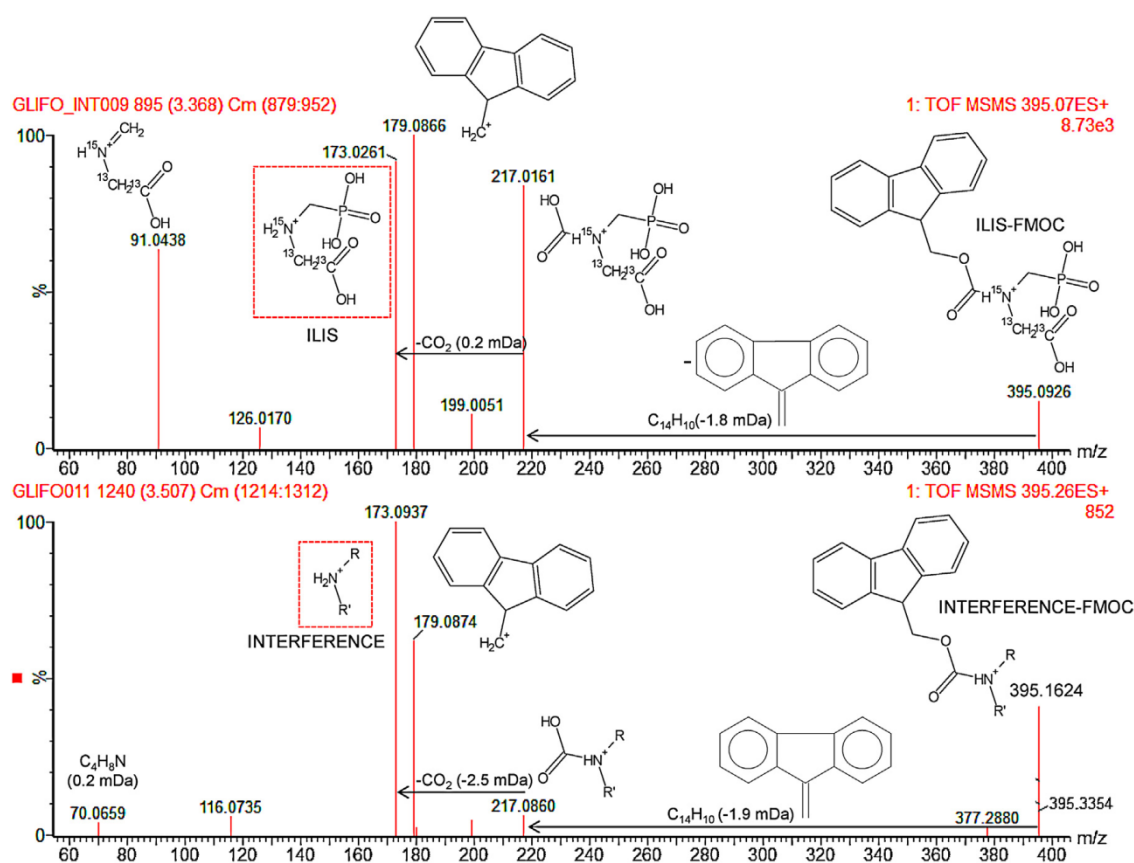


Fig. 2. LC-QTOF MS/MS spectra of ILIS-FMOC (top) and of soil interference (bottom).

Using Oasis MAX (procedure A1), the results were not satisfactory. A possible explanation could be that analytes-FMOC derivatives remained in the cartridge, as low responses were obtained in the eluates. Following procedure A2 (Oasis HLB), rather satisfactory results were obtained in terms of analyte recovery (mean recoveries of 79% and 80% for GLY and AMPA, respectively). However, the robustness was poor, surely due to the sample handling and the final evaporation process for solvent exchange. The retention of the GLY-FMOC derivative in Oasis HLB and its subsequent elution with acetone or methanol seemed efficient, but this option was discarded because of the extensive sample manipulation required.

Procedure B consisted on performing the SPE clean-up before derivatization with FMOC. In this case, the analytes should pass the cartridge when loading the soil extract without being retained as a consequence of their high polarity/ionic character, while some matrix

components are expected to be retained into the cartridge. Oasis HLB was only tested using this approach. A soil extract was spiked at 250 µg/L and the pH was adjusted to 1, 3, 6 or 9 before loading the extract onto the SPE Oasis HLB cartridge.

The spiked alkaline extract was also loaded directly without pH adjustment (pH approx 14). Then, the extract passing through the cartridge was collected and derivatized with FMOC, as shown in Fig. 1.

The combination of adjusting pH and applying a subsequent SPE clean-up had noticeable effect at pH 1 and pH 9, leading to a notable increase in the response as a consequence of less matrix effects. Thus, an increasing factor of 15–20 in the signal was observed for the soils tested. As shown in Fig. 3, the best results in terms of increasing MS signal were obtained at pH 9 for three out of four soils tested. One of the soils (COL003) presented better response at pH 1, although the difference with respect to pH 9 was not much relevant. Therefore, adjusting the soil extract to pH 9 before SPE clean-up was selected for subsequent experiments.

Despite the clean-up applied, the use of ILIS was necessary for matrix effect correction, as recoveries around 25% were obtained when quantification was made with standards in solvent without ILIS. The ILIS was added to the soil extract before SPE to also correct for potential analyte losses that might occur during this step. After application of clean-up to soil extracts at pH 9, recoveries were rather satisfactory using ILIS correction, however a bad peak shape was observed for most of the samples. At this point, the dilution of soil extracts with HPLC-grade water was assayed as a fast and simple way to minimize matrix content. The four soil samples tested were fortified at 4.5 mg/kg and their extracts diluted 2, 5 and 10-times before derivatization. According to our results, the three dilution factors tested led to a more accurate quantification, but the dilution alone was insufficient for satisfactory data being necessary in all cases to use ILIS for quantification. Finally, a 2-fold dilution was selected as a compromise between recovery, sensitivity and peak shape.

Apart from the four soils used as a model, matrix effects were tested for many other soils by comparison of the ILIS responses in solvent and in soil extracts after the clean-up described (**see Table S2, SI**). With a few exceptions, strong signal suppression (higher than 70%), was still observed for most of the soils, highlighting the need of correction with ILIS. This fact is

illustrative of the great difficulties of this type of sample matrices.

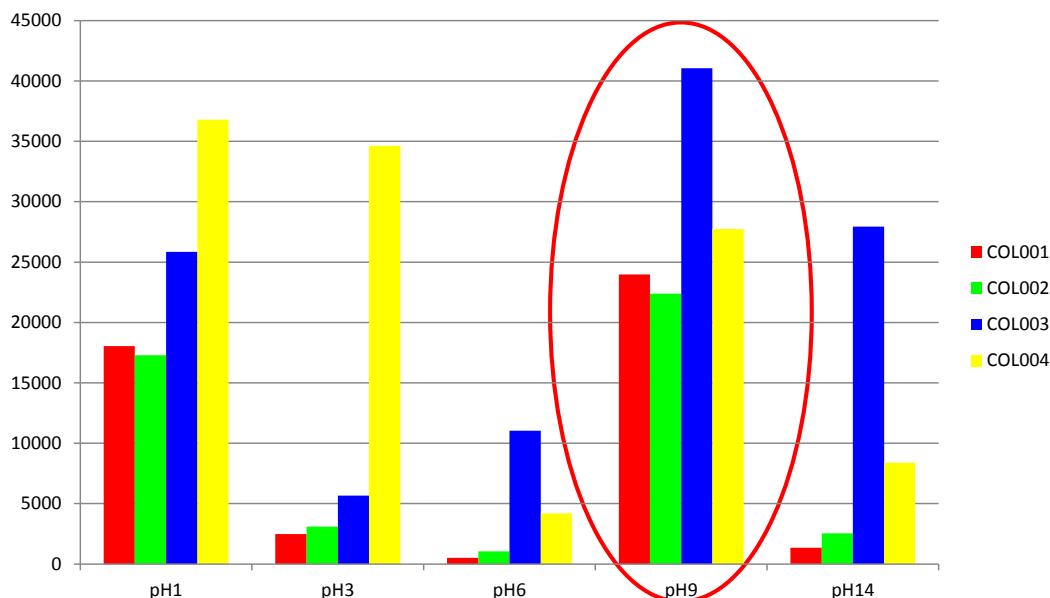


Fig. 3. Effect of the pH of the soil extract on the absolute GLY response for four soils extracts subjected to clean-up with Oasis HLB.

Method validation

The method was validated in four soils, two from Colombia and two from Argentina, following the recommended procedure (**Fig. 1, procedure B**).

Standards calibration showed satisfactory linearity in the studied range (5–2500 g/L) with correlation coefficients ≥ 0.99 and residuals lower than 20%. This range was equivalent to 0.05–25 mg/kg in the sample.

Accuracy and precision were estimated by means of recovery experiments, by spiking the soil samples at 0.5 and 5 mg/kg, in quintuplicate. The results obtained were satisfactory for GLY in all soils, with recoveries between 92% and 107% at the 5 mg/kg level, and between 79% and 117% at 0.5 mg/kg. RSDs were below 15% in all cases (**Table 2**). For AMPA, recoveries were mostly between 65% and 89%, although the Colombian soils showed

slightly lower values around 50%. The reason of the lower AMPA recoveries might be found on the worse peak shape and a possible poorer correction using the glyphosate ILIS.

It is interesting to remark that one of the soils used in the validation experiments (COL001) presented GLY and AMPA concentrations around 1.8 mg/kg. Therefore, the validation could not be satisfactorily made at the 0.5 mg/kg level.

LOQs and LODs were estimated from the SRM chromatograms of samples spiked at the lowest level tested. LOQs were found to be 0.05 mg/kg for GLY and 0.03 mg/kg for AMPA, while LOD were 0.02 mg/kg and 0.01 mg/kg, respectively.

Table 2 Method validation in different soils. Recommended 5 procedure B (n =5).

SOIL	non-spiked soil		5 mg/Kg				0.5 mg/Kg			
	GLY	AMPA	GLY		AMPA		GLY		AMPA	
	mg/kg	mg/kg	Rec(%)	RSD(%)	Rec(%)	RSD(%)	Rec(%)	RSD(%)	Rec(%)	RSD(%)
ARG001	0.11	0.80	102	6	84	10	117	7	82	13
ARG002	0.30	0.78	92	6	89	17	79	11	75	19
COL001	1.86	1.80	102	15	53	22	-	-	-	-
COL002	0.19	0.29	107	5	43	8	82	6	65	18

-: not calculated due to the high analyte concentration in the “blank” non-spiked sample.

Analysis of soil samples

The validated method was applied to the analysis of 26 samples from different areas of Argentina (11 soils) and Colombia (15 soils). To ensure the quality of the analysis when processing real- world samples, “blank” soil samples fortified at 0.5 and 5 mg/kg were used as quality controls (QC) and were distributed along the batch of samples every 4–5 injections. Taking into account the difficulties of this residue determination, the high variability of the physicochemical properties of the soils, and the strong matrix effects that affect this type of analysis, performing a validation in a given soil seems insufficient to demonstrate the method robustness and applicability. To this aim, the use of QCs is surely the best way to give a realistic information on the method performance. In this work, six soils were used as QCs along 4 months of sample analysis. Accepting QCs recoveries between 60% and 140% [26], the results were satisfactory for GLY and AMPA at the 5 mg/kg level (81–91% GLY, and 66–119% AMPA) in the six soils tested. At the 0.5 ppm spiked level, QCs

recoveries were between 52% and 83% (GLY) and between 39% and 120% (AMPA), with the lowest values being obtained for the two Colombian soils (52% and 56% GLY; 39–41% AMPA). On the contrary, at the low level of fortification the soils from Argentina seemed to be less problematic, with satisfactory recoveries, between 69% and 83% (GLY) and between 68% and 120% (AMPA). This fact supports our previous findings on that Colombian soils were particularly problematic for AMPA, as illustrated by the non-compliance of the Q/q ratio for some of them. In addition, it must be taken into account that calculation of QC recoveries at the 0.5 mg/kg is subjected to higher errors as the soils used for preparing quality controls contained GLY and AMPA. Therefore, for calculation of recoveries the amount present in the blank samples must be subtracted from the amount calculated after analysis of fortified samples.

Table 3 shows a summary of the results obtained. Both, GLY and AMPA, were found in nearly all the samples analyzed, which is in agreement with the wide use of this herbicide in both countries. Normally, the residue levels were higher in the soils from Colombia, reaching values up to 3.8 mg/kg glyphosate. This herbicide was detected in 13 out of 15 Colombian samples and the concentrations were above 1 mg/kg in 9 of these samples. As regards AMPA, it was also detected in 13 out of 15 samples, and the levels were normally lower than for GLY, reaching a maximum concentration of 2.1 mg/kg. 3 out of 15 samples contained AMPA concentrations above 1 mg/kg. In relation to the soils from Argentina, both compounds were detected in 10 out of 11 samples. GLY and AMPA concentrations in these soils were all below 1 mg/kg, with only two exceptions (AMPA concentrations in soils ARG003 and ARG004 were 1.0 and 1.2 mg/kg, respectively).

Positive findings need to be confirmed by at least two MS/MS transitions and one Q/q ratio, which should fit with that of reference standards with maximum deviations between 10% and 50% depending on the Q/q ratio value [26,28]. The agreement of retention time is also required, with deviations lower than 2.5% respect to a reference standard. In this work, the tolerances for GLY were 25% for Q/q₁ (ion ratio 2.6) and 20% for Q/q₃ (ion ratio 1.9). Q/q₂ was not used for confirmation as it was interfered in several samples. Using Q/q₁ ratio the identity of GLY could be confirmed in the Colombian soils. In two samples the ion ratio deviations were out of tolerance (COL001, COL002), but the identity of GLY was confirmed making use of Q/q₃ ratio (**Table 3**). The confirmation of GLY in the soils from Argentina was

more problematic, as Q/q₁ seemed to be interfered in 6 out of 10 positive samples. Again, the use of an alternative transition (Q/q₃) allowed a reliable confirmation in all the samples. In all cases, the retention time was within $\pm 2.5\%$ deviation. In summary, GLY could be finally confirmed in all soils where it was detected.

The situation for AMPA was more problematic in terms of confirmation, as only two transitions were available, and the quantification transition (334 \rightarrow 179) seemed to be interfered in most of the soil samples. This led to Q/q ratios higher than expected, above the maximum admissible deviation of $\pm 25\%$ (theoretical Q/q ratio was 2.6). Thus, ion ratio for AMPA was out of tolerance in 7 out of 15 the Colombian soils, and in 2 out of 11 Argentina soils. In these cases, we did not found an alternative criterion for confirmation, although the compliance of retention time, as well as the presence of chromatographic peaks at the two transitions acquired, together with the presence of GLY in these samples, suggested that the compound detected was AMPA actually. More research seems necessary at this point, as well as to accept the possibility to admit higher tolerances in difficult analyte/matrix combinations like occurs in the residue determination of GLY and AMPA in soils. For example, enlarging the tolerance up to 50%, as recently suggested [34], 8 out of the 9 soils that could not be previously confirmed for AMPA would be now confirmed. The fact that the transition used for AMPA quantification (the most sensitive one, 334 \rightarrow 179) was interfered in some of the soils is particularly problematic, as it does not only affect to confirmation but also to quantification. To evaluate the relevance of this fact, the soils that were out of ion ratio tolerance (**marked as “x” in Table 3**) were requantified using the q transition (less sensitive but more selective). In most of these soils, AMPA concentration resulting from q calculation was lower than using the Q transition, although both data were rather similar.

Table 3. Quantification and confirmation of GLY and AMPA in soil sample.

SOIL	GLYPHOSATE			AMPA		
Colombia	Conc (mg/kg)	Q/q ₁ ratio	Q/q ₃ ratio	Conc (mg/kg)	Q/q ratio (tolerance 25% or 50%)	
COL001	1.86	×	✓	1.80	✓	✓
COL002	0.19	×	✓	0.29	✓	✓
COL003	2.70	✓		0.56	×	×
COL004	n.d.	--		n.d.	--	--
COL005	0.84	✓		0.55 (0.32) ^(a)	×	×
COL006	1.74	✓		1.14	✓	✓
COL007	1.46	✓		0.49	✓	✓
COL008	1.05	✓		0.42 (0.29)	×	✓
COL009	1.23	✓		0.89 (0.67)	×	✓
COL010	n.d.	--		n.d.	--	--
COL011	0.78	✓		0.67	✓	✓
COL012	1.72	✓		0.81(0.83)	×	✓
COL013	0.68	✓		0.28(0.33)	×	✓
COL014	1.34	✓		0.91(0.87)	×	✓
COL015	3.82	✓		2.07(1.93)	×	✓
Argentina						
ARG001	0.11	×	✓	0.80	✓	✓
ARG002	0.30	✓		0.78	✓	✓
ARG003	0.17	×	✓	1.04	✓	✓
ARG004	0.28	×	✓	1.19	✓	✓
ARG005	0.10	×	✓	0.41	✓	✓
ARG006	0.41	✓		0.17(0.10)	×	✓
ARG007	0.49	×	✓	0.30	✓	✓
ARG008	0.41	×	✓	0.18(0.11)	×	✓
ARG009	0.49	✓		0.26	✓	✓
ARG010	0.67	✓		0.69	✓	✓
ARG011	n.d.	--		n.d.	--	--

a Concentration calculated using Q and q (in brackets) transitions for those soils where AMPA was out of Q/q ratio tolerance.

(✓) Ion ratio deviation within the admitted maximum tolerances.

(x) Ion ratio deviation out of admitted maximum tolerances.

This supports our hypothesis that quantification transition (Q) was interfered in these soils leading to positive errors in quantification. Under this situation, we suggest the following approach for AMPA quantification in “difficult” soils: (1) perform analysis of soils using the most sensitive transition (334 → 179); (2) calculate Q/q ratio and check whether it fits the maximum deviations accepted (in our case 25%); if so, report the concentration value obtained; (3) if ion ratio is out of tolerance, recalculate AMPA concentration using the less sensitive q transition (334 → 112). As regards confirmation, we suggest to increase the tolerance in ion ratio deviations to 50% as a realistic approach in this type of analysis. The problematic of confirmation identity by ion ratios accomplishment has been recently discussed when using HRMS, and increasing the tolerance has been already suggested in some particular cases [34–36]. Although technical capabilities of triple quadrupole and Orbitrap or QTOF MS are different, and using ion ratios in SRM transitions or in accurate-mass ions is also different, we consider that increasing tolerances in situations like that reported in this article is needed to have a realistic answer to problematic analyte/matrix combinations.

The use of HR MS is an attractive option for confirmation in some particular/problematic cases on the basis of accurate mass measurements. The potential of HR MS (e.g. Orbitrap or (Q)TOF MS) for quantification has been much less explored in the scientific literature, and its lower sensitivity in comparison to LC-MS/MS with triple quadrupole appears as a limitation for quantification purposes. Therefore, the application of HR MS in this particular case needs to be carefully studied to have detailed information on its realistic potential.

As an example of the method performance, Fig. 4 illustrates the detection and confirmation of the two compounds in the soil COL006, which contained 1.74 mg/kg GLY and 1.14 mg/kg AMPA.

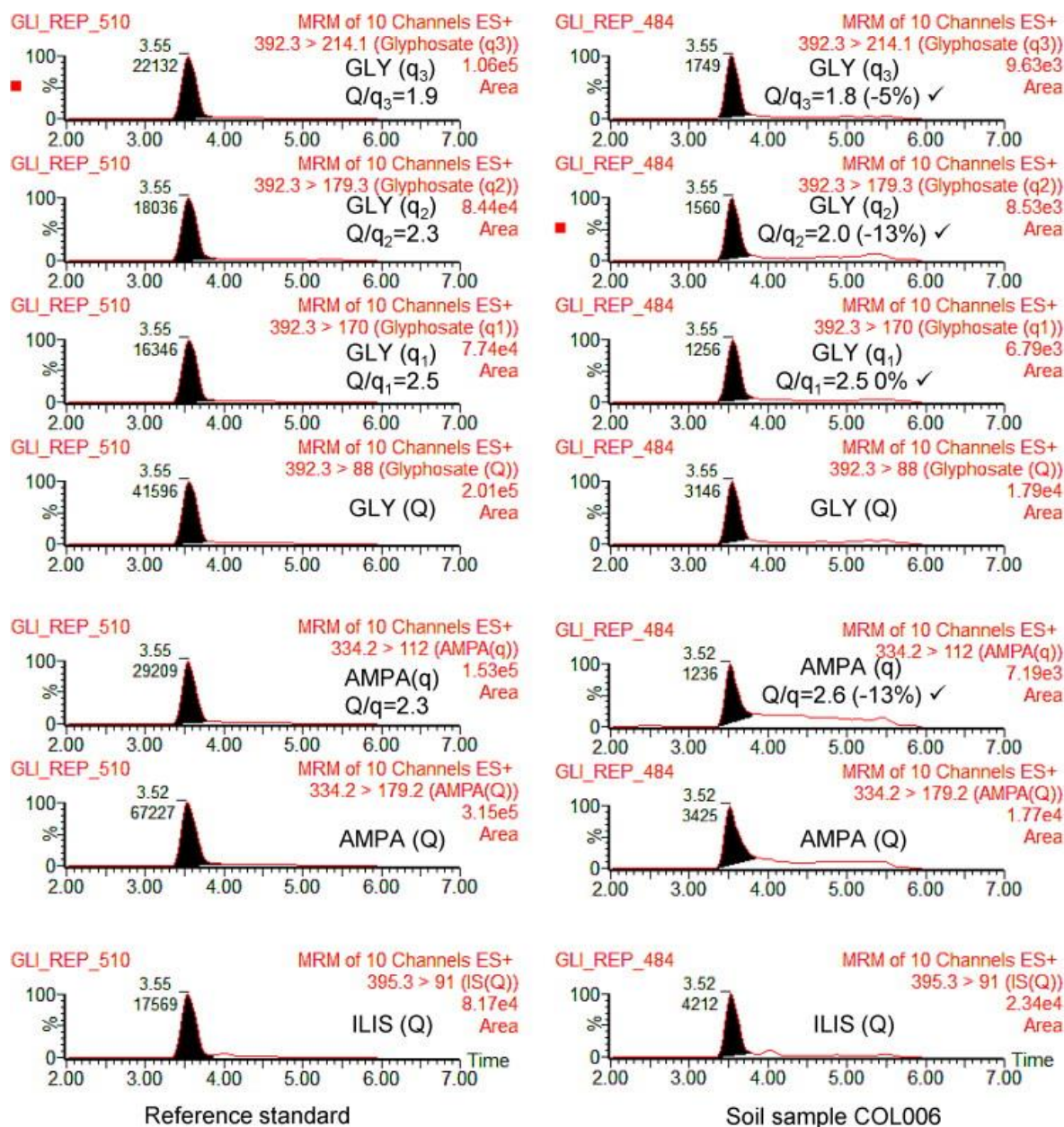


Fig. 4. LC-MS/MS chromatograms of GLY-FMOC, AMPA-FMOC and ILIS-FMOC for reference standards (left) and for the soil sample COL006, containing 1.74 mg/kg of GLY and 1.14 mg/kg of AMPA (right).

CONCLUSIONS

This work has shown the problems associated to the residue determination of glyphosate and AMPA in “difficult” soils like those frequently found in South America, commonly with high organic matter content. Even using a powerful, sensitive and selective technique like LC–MS/MS, several problems associated to matrix effects (strong ionization suppression) and to the presence of interfering compounds have been observed in most of the soils tested. A clean-up step was required, resulting from a combination of sample extract dilution, adjusting the soil extract to pH 9 and a SPE with OASIS HLB cartridges, followed by derivatization with FMO. Satisfactory results were obtained for GLY in validation experiments using isotope-labelled glyphosate as ILIS. Most recoveries were also satisfactory for AMPA, although values near 50% were obtained in some samples. Although not tested in this work, the use of AMPA ILIS might be a good option to improve the results for this analyte.

A careful study was made on the presence of matrix components that shared the transitions of GLY, AMPA and even of ILIS used for matrix effects correction. Particularly problematic were those transitions where m/z 179 was used as product ion. This ion comes from the fragmentation of the derivatized molecules and is related with FMO. Therefore, it is not specific for GLY and AMPA, and should be avoided. The acquisition of all available transitions instead of the two typically acquired in LC–MS/MS methods is recommended. In any case, confirmation of the identity by ion ratio criterion seems problematic in this type of analysis. The use of wider ion ratio tolerances than those currently set in the EU may be desirable. QTOF MS is an interesting tool to reveal matrix interferences and/or to help in making an appropriate selection of the ions used in analyses. Its high resolution and mass-accuracy makes feasible the discrimination of matrix interferences. While the strong potential of QTOF MS is widely recognized in qualitative analysis, its applications for quantification purposes have been rather limited until now. Despite its lower sensitivity in comparison with LC–MS/MS, LC–QTOF MS appears as an attractive tool to face the analysis of glyphosate in soils, and it is worth to be investigated in the near future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQD mass spectrometer. The authors acknowledge the help of Virginia Aparicio and Jose Luis Costa, from INTA (Balcarce, Buenos Aires), for providing the soil samples from Argentina (project AEGA, Ref 221641), and Martha Cristina Bustos, from Universidad Nacional (UNAL), for providing soil samples from Colombia.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.007>.

REFERENCES

- [1] R. Glass, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 497.
- [2] A. Piccolo, G. Celano, P. Conte, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2442.
- [3] F. Veiga, J.M. Zapata, M.L. Fernandez Marcos, E. Alvarez, *J. Chromatogr. A* 271 (2001) 135.
- [4] A. Araújo, R. Monteiro, R. Abarkeli, *Chemosphere* 52 (2003) 799.
- [5] M. Hart, P. Brookes, *Soil Biol. Biochem.* 28 (1996) 1641.
- [6] R. Haney, S. Senseman, F. Hons, D. Zuberer, *Weed Sci.* 48 (2000) 89.
- [7] D. Landry, S. Dousset, J.C. Fournier, F. Andreux, *Environ. Pollut.* 138 (2005) 191.
- [8] M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 145.
- [9] M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 51.
- [10] D.W. Kolpin, E.M. Thurman, E.A. Lee, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.T. Glassmeyer, *Sci. Total Environ.* 354 (2006) 191.
- [11] A. Ghanem, P. Bados, A.R. Estaun, L. Felipe de Alencastro, S. Taibi, J. Einhorn, C. Mougin, *Chemosphere* 69 (2007) 1368.
- [12] P.J. Peruzzo, A.A. Porta, A.E. Ronco, *Environ. Pollut.* 156 (2008) 61.
- [13] C.N. Albers, G.T. Banta, P.E. Hansen, O.S. Jacobsen, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 2865.
- [14] C. Hidalgo, C. Rios, M. Hidalgo, V. Salvadó, J.V. Sancho, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 153.
- [15] J.V. Sancho, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, P.V. Zoonen, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 75.
- [16] J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, *J. Environ. Anal. Chem.* 62 (1996) 53.

- [17] F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, JAOAC Int. 83 (2000) 728.
- [18] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2265.
- [19] R.J. Vreeken¹, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M. Noij, J. Chromatogr. A 794 (1998) 187.
- [20] E.A. Lee, L.R. Zimmerman, B.S. Bhullar, E.M. Thurman, Anal. Chem. 74 (2002) 4937.
- [21] A. Ghanen, P. Bados, L. Kerhoas, J. Dubroca, J. Einhorn, Anal. Chem. 79 (2007) 3794.
- [22] X. Li, J. Xu, Y. Jiang, L. Chen, Y. Xu, C. Pan, Acta Chromatogr. 21 (2009) 559.
- [23] N. Yoshioka, M. Asano, A. Kuse, T. Mitsuhashi, Y. Nagasaki, Y. Ureno, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3675.
- [24] EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS determination, Version 4, 2010, p. 19 www.crl-pesticides.eu
- [25] H.A. Martins-Júnior, D.T. Lebre, A.Y. Wang, M.A.F. Pires, O.V. Bustillos, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 1029.
- [26] European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance Document on Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/10684/2009, 2010.
- [27] European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, SANCO/825/00 rev.8.1, 2010.
- [28] Commission Decision 2002/657/CE of 12 August 2002.
- [29] E. Borjesson, L. Torstensson, J. Chromatogr. A 886 (2000) 207. [30] C.J. Miles, H.A. Moye, J. Agric. Food Chem. 36 (1998) 486.
- [31] T.V. Nedelkoska, G.K.C. Low, Anal. Chim. Acta 511 (2004) 145.

- [32] M. Ibañez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, W. Niessen, F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 169.
- [33] O.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibañez, F. Hernández, W.M.A. Niessen, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 1030.
- [34] H.G.J. Mol, P. Zomer, M. de Koning, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2891.
- [35] T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 303.
- [36] I. Cervera, T. Portolés, E. Pitarch, J. Beltrán, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1244 (2012) 168.

Journal of Chromatography A
SUPPLEMENTARY INFORMATION

Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellon, Spain

Elucidation of an unknown sample matrix component that interfered ILIS-FMOC

An attempt to elucidate this unknown was made following the strategy previously reported [32]. Possible elemental compositions for m/z 173.0937, with a maximum deviation of 3 mDa from the measured mass, were calculated using the Elemental Composition program within the MassLynx software. A minimum of 1 N, 4 C and 8 H atoms were considered taking into account the general structure depicted in **Figure 2** for this ion as well as the product ion at m/z 70.0659 (C_4H_8N as the only possibility). O, F, P and S were considered without restrictions. The double bond equivalent (DBE) parameter was set from -0.5 to 50, giving information about aromaticity of the structure. Additionally, the option "even electron ions only" was selected, as this ion was obtained after two consecutive neutral losses ($-CO_2-C_{14}H_{10}$) from a protonated molecule. Within the search limits outlined above, five possible elemental compositions for m/z 173.0937 were obtained: $C_4H_{14}N_2O_4F$, $C_7H_{12}N_3OF$, $C_5H_{15}N_2F_2S$, $C_5H_{10}N_6F$ and $C_6H_{14}N_4P$ (expressed as protonated molecules). An elemental formula fit for the carboxylated form of the unknown interference (m/z 217.0860) was also performed, considering the following restrictions: C:5-8; H: 12-15; N: 2-6; F:0-2; P: 0-1; S:0-1. Again, the option "even electron ions only" was selected as this ion was obtained after a CO_2 neutral loss from a protonated molecule. Four possibilities were obtained: $C_5H_{17}N_2O_5S$, $C_7H_{14}O_2N_4P$, $C_6H_{10}N_6O_2F$ and $C_5H_{14}N_2O_6F$. By overlapping both tables, the number of plausible elemental compositions for m/z 173.0937 was reduced to three $C_4H_{14}N_2O_4F$, $C_5H_{10}N_6F$ and $C_6H_{14}N_4P$ (expressed as protonated molecule). These formulae were searched for potential structures in chemical databases. We choose Reaxys (Elsevier), a web-based search and retrieval system for chemical compounds, bibliographic data and chemical reactions that contains more than 18.000.000 substances, as well as ChemSpider, which links together compound information across the web, providing free text and structure search access of millions of chemical structures. No hits were found for $C_4H_{13}N_2O_4F$ and $C_5H_9N_6F$. After searching the formula $C_6H_{13}N_4P$ only one hit was found in ChemSpider, but none chemical structure supported by the fragment ions observed could be finally proposed.

Table 1. SI_Physico-chemical properties of the model soils used in this study, collected from Colombia and Argentina.

SOIL	%SAND	% SILT	%CLAY	CLASS	pH	% OM	% total N
COL001	36.9	39.3	23.8	Loam	4.3	4.31	0.18
COL002	37.5	48.6	13.9	Loam	4.4	2.24	0.15
COL003	4.3	13.5	82.2	Clay	4.2	0.60	0.36
COL004	19.3	33.4	47.3	Clay	4.5	4.48	0.19
ARG001	23.0	51.7	25.3	Silt loam	6.0	3.10	0.16
ARG002	6.5	14.5	79.9	Clay	4.6	2.71	0.17

OM: organic matter

Table 2. SI₂Signal suppression (%) calculated from the area of ILIS added to different soil extracts

Area ILIS-FMOC STANDARDS IN SOLVENT Standard in solvent (n=10)	Area ILIS-FMOC Soil extract (n=2)		% signal suppression
	SOIL	AREA	
14530	COL001	3332	77
	COL002	4238	71
	COL003	774	95
12803	ARG001	4016	69
	ARG002	3008	77
	COL010	3440	73
	COL011	804	94
	ARG005	5170	60
14097	ARG009	7338	48
	ARG010	2708	81
	ARG011	7152	49
14114	ARG006	9248	34
	ARG007	6549	54
	ARG008	10794	24
14190	COL012	607	96
	COL013	2069	85
	COL015	1509	89
	COL004	418	97
	COL014	1014	93
15242	COL005	1907	87
	COL006	4228	72
	COL007	1213	92
	ARG007	6383	58
15950	COL008	3582	78
	COL009	2251	86
	COL011	3993	75

3.2.2 Discusión de los resultados

Como se ha indicado anteriormente, nuestro grupo de investigación lleva bastantes años desarrollando metodología analítica para residuos de GLY en distintos tipos de muestras de interés ambiental y alimentario. Todos nuestros métodos desarrollados hasta la publicación de este artículo se han basado en la derivatización pre-columna con FMOC y las medidas se han realizado mediante LC-LC/FD en los primeros trabajos (década de los 90), y mediante LC-MS/MS en la década de los 2000. Los últimos métodos desarrollados para aguas y suelos, basados en LC-MS/MS previa derivatización con FMOC, dieron excelentes resultados, lo cual quedó reflejado en las correspondientes publicaciones (Ibáñez, 2005, 2006). Sin embargo, al intentar analizar suelos procedentes de Colombia, se encontraron dificultades inesperadas: en ocasiones, la fortificación de suelos no conducía a ningún incremento en la señal del GLY; al añadir el patrón interno (ILIS) parecía ser completamente “anulado” por la matriz del suelo, y no daban ningún tipo de señal; o cuando parecía obtenerse algún resultado esperanzador, la reproducibilidad era inaceptable. Ante todo esto, se planteó la necesidad de realizar una modificación de la metodología analítica que, aunque funcionaba correctamente con los suelos españoles analizados hasta el momento, no proporcionaba resultados satisfactorios en los suelos de Colombia que se pretendía estudiar. En esta Tesis los esfuerzos se centraron principalmente en la etapa de tratamiento de muestra, con el fin de reducir el severo ME que se observaba en este tipo de suelos

Como se verá en esta discusión, fueron varios las modificaciones que se realizaron sobre la anterior metodología, hasta que los resultados fueron finalmente satisfactorios. Junto a los suelos de Colombia, que resultaron ser los más problemáticos, también se estudiaron suelos de Argentina, en el marco de la colaboración con el INTA, Balcarce (Dr. José Costa y Dra. Virginia Aparicio).

Optimización cromatográfica y de las condiciones MS/MS

Las condiciones cromatográficas y de masas para GLY y AMPA, ya derivatizados con FMOC, se adaptaron a partir de las reportadas en trabajos anteriores del grupo de investigación (Ibáñez et al., 2005), resultando finalmente las que se indican en la **Tabla 1, Artículo científico 4**.

Se seleccionaron dos transiciones para AMPA y cuatro para GLY. La transición más intensa (Q) se usó para la cuantificación, y el resto de transiciones (una para AMPA y tres para GLY) se usaron para la confirmación de la identidad del compuesto a través de la medida de la relación de intensidades Q/q. Aunque para el ILIS sólo resultó necesaria una transición (normalmente Q, usada para cuantificación), se adquirieron hasta cuatro con el fin de estudiar las posibles interferencias de los componentes co-extraídos del suelo.

Los fragmentos obtenidos en modo de ionización positivo se justifican en las **figuras 3.11 y 3.12**. Por otra parte, la sensibilidad obtenida en modo positivo fue mayor a la observada en modo negativo (Ibañez, 2007).

En cuanto a la separación cromatográfica, se usó una columna Discovery® C18 de Supelco (50 mm x 2.1 mm, 5µm) y se estudió el uso de MeOH y ACN en la fase móvil, así como el efecto de la adición de modificadores (HAc/NH₄Ac); HCOOH/NH₄Fm).

En las condiciones de trabajo finalmente seleccionadas, GLY y AMPA prácticamente coeluyeron (GLY 3.55 min, AMPA 3.52 min), aunque esto no supuso ningún problema ya que se adquirieron transiciones diferentes.

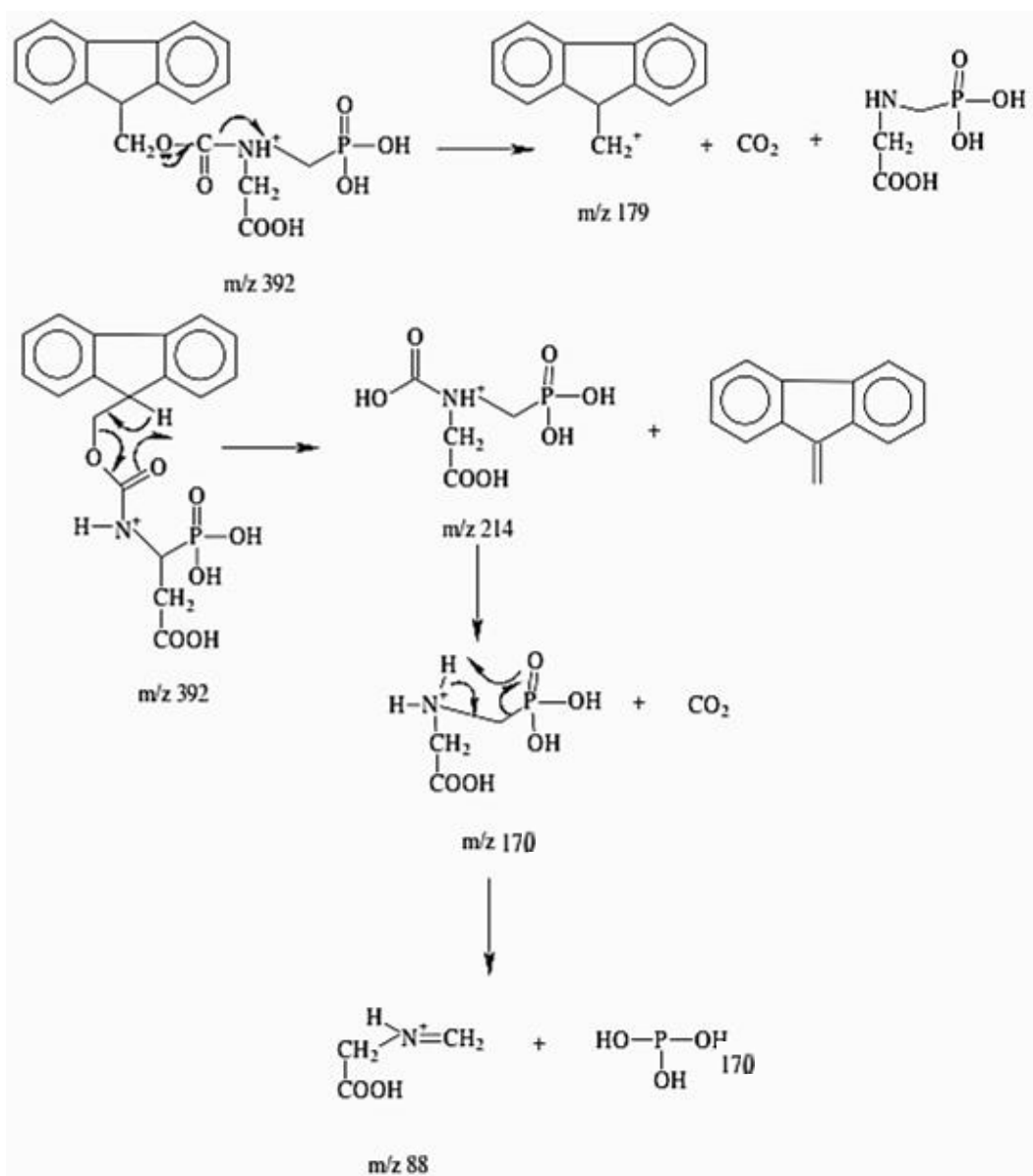


Figura 3.11 Ruta de fragmentación del GLY-FMOC en MS/MS modo ESI positivo (tomado de Ibañez, 2007).

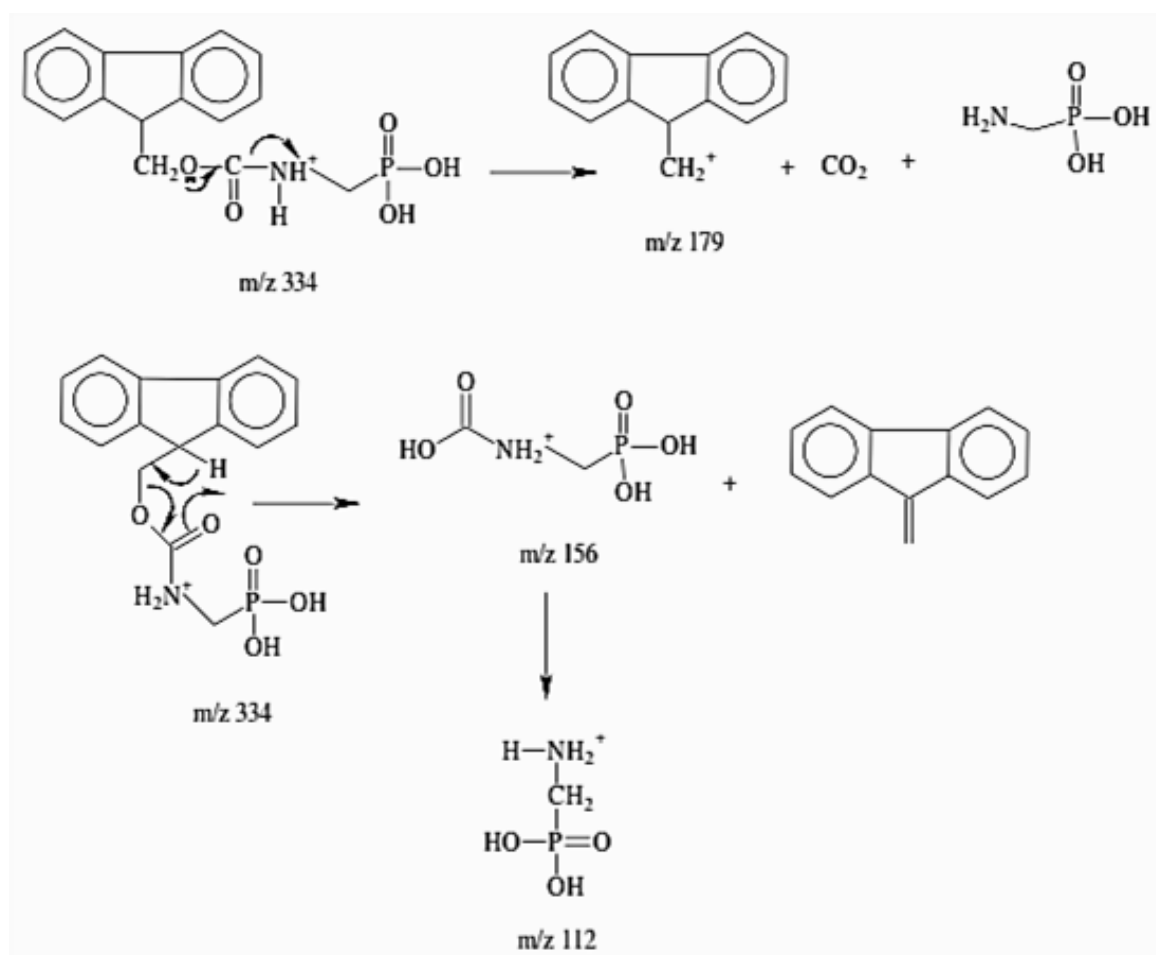


Figura 3.12 Ruta de fragmentación del AMPA-FMOC en MS/MS modo ESI positivo (tomado de Ibáñez, 2007)

Tratamiento de muestra

El tratamiento de muestra se realizó sobre la base de los trabajos previos del grupo, en lo relativo a la extracción del suelo y condiciones de derivatización con FMOc (**figura 3.13**) (Ibañez, 2007). Como se ha indicado antes, en este trabajo los esfuerzos se centraron en la etapa de *clean-up*, necesaria dado el fuerte ME observado en este tipo de suelos, cuyas propiedades físico-químicas fueron notablemente diferentes a los anteriormente analizados en el laboratorio, como se muestra en el **Artículo Científico 4 (Tabla 1, supplementary information)**.

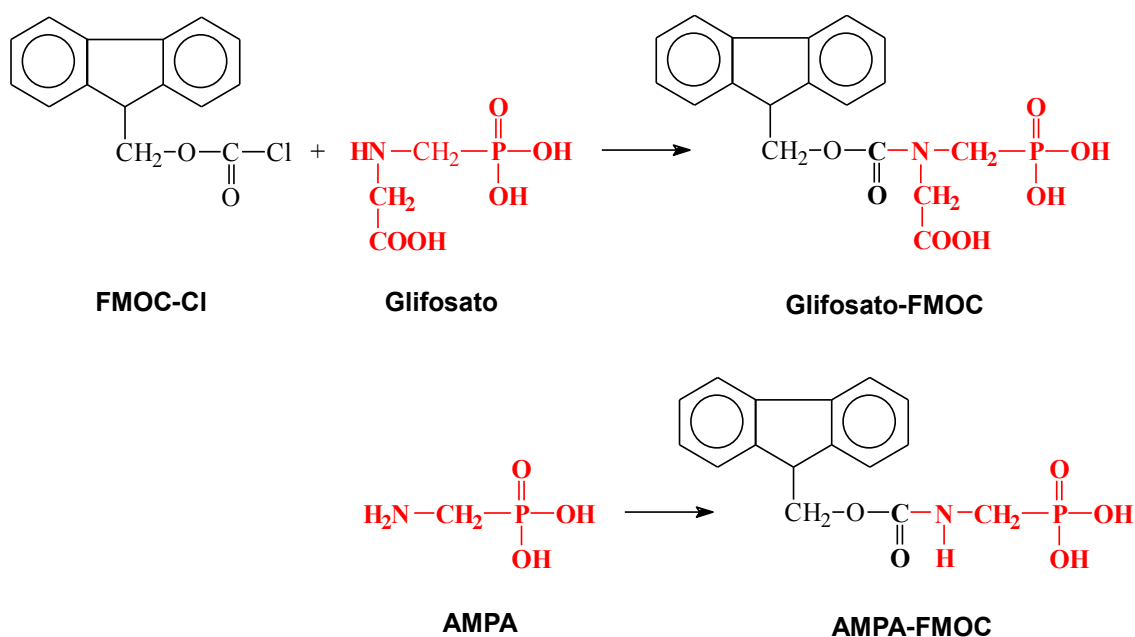


Figura 3.13 Reacción de derivatización del GLY y AMPA con el reactivo FMOc

Las muestras objeto de estudio fueron 15 suelos Colombianos de la zona sur y noroccidental del país (Guaviare, Norte de Santander, Antioquia y Putumayo) y 11 suelos Argentinos (Mar de Plata). Se tomaron en áreas con intensa actividad agrícola, en las que se presume una aplicación frecuente del herbicida GLY. Los suelos fueron secados a temperatura ambiente y homogenizados, antes de proceder a su extracción con KOH 0.6 M. Del sobrenadante, se tomó una alícuota y se diluyó (dil x 2) con agua HPLC, añadiendo el patrón interno marcado isotópicamente (ILIS) (1,2 - ^{13}C , ^{15}N glyphosate 1.1 mg/L). Después de ajustar a pH= 9, el

extracto de la muestra se pasó por un cartucho OASIS HLB (60 mg) y el eluato que pasó a través del cartucho se derivatizó con FMOC durante toda la noche. Finalmente, se ajustó a pH 1.5 con HCl y se inyectó en LC-MS/MS (20 µL), bajo las condiciones cromatográficas y de MS estudiadas anteriormente. El procedimiento aplicado a las muestras de suelos se explica con detalle en el **Artículo Científico 4 (recommended procedure)**.

Estudio de la etapa de *clean-up*: efecto matriz

Las experiencias realizadas en suelos colombianos en ausencia de *clean-up*, no fueron satisfactorias, observándose que el ILIS no era capaz de corregir adecuadamente el fuerte ME. Además, el método aplicado presentaba poca robustez, con una pobre reproducibilidad, obteniéndose datos poco fiables. Esto llevó a modificar el método aplicando una serie de etapas en las que se incluían pruebas de diluciones y aplicación de *clean-up* mediante SPE, a diferentes pH, antes y después de la derivatización con FMOC.

Se usaron dos tipos de experiencias en el *clean-up* mediante SPE:

- Derivatización de los analitos con FMOC y posterior *clean-up* mediante SPE. En este caso, se esperaba que los analitos derivatizados se retuviesen en el cartucho, y que los posibles interferentes pasasen a través del mismo como compuestos no retenidos, o bien que no fuesen eluidos con el disolvente usado para la elución de los analitos (Procedimiento A)
- Paso del extracto de suelo por el cartucho de SPE, con posterior derivatización del eluato obtenido. En este caso, se esperaba que los analitos pasasen a través del cartucho como compuestos no retenidos, gracias a su elevada polaridad/carácter iónico, mientras que algunos componentes de la matriz apolares y de polaridad media/alta pudiesen quedar retenidos en el cartucho. En este procedimiento, la derivatización se llevó a cabo después de la etapa de SPE (Procedimiento B).

El **procedimiento A** se ilustra en la **Figura 3.14**. Se probaron dos tipos de cartuchos: Oasis MAX, diseñados para lograr una mayor selectividad para compuestos ácidos, con grupos de intercambio aniónico, y Oasis HLB, con un relleno polimérico de fase reversa, con balance

hidrofílico-lipofílico, adecuados para la extracción en fase sólida de una amplia gama de compuestos ácidos, básicos y neutros.

Después de extraer el suelo con 10 mL de KOH 0.6M, el extracto de suelo obtenido se diluyó tomando 1 mL del sobrenadante y 1 mL de agua HPLC, se ajustó a pH 9 y se le adicionó 200 μ L del (ILIS) de 1.1 mg/L. La derivatización se llevó a cabo en las condiciones generales de este trabajo, usando 2mL del extracto a los que se añadió 120 μ L de disolución amortiguadora borato y 120 μ L de Fmoc 12.000 ppm. Se dejó reposar toda la noche y, una vez derivatizados los analitos, se pasó el extracto derivatizado a través de los cartuchos de SPE. La elución se realizó con 4 mL de disolvente orgánico (MeOH o ACN, a pH 1.5). Para poder inyectar el extracto en el sistema LC-MS/MS fue necesario un cambio de disolvente, previa evaporación con N_2 y reconstitución con agua (pH 1.5): ACN (90:10). Después de reposar 1 h, pues algunas muestras precipitaban, se inyectó finalmente 20 μ L en el sistema LC-MS/MS.

El uso de cartuchos OASIS MAX (A1) no condujo a resultados satisfactorios, con bajas recuperaciones, posiblemente debido a la retención incompleta de los analitos derivatizados en el cartucho (o a la incompleta elución del derivatizado retenido por el cartucho). Los OASIS HLB (A2) condujeron a resultados más satisfactorios, con recuperaciones del orden del 80% para GLY y AMPA. A pesar de ello, se descartó este procedimiento pues era muy laborioso, con mucha manipulación de muestra, y resultó poco robusto.

En el **procedimiento B (figura 3.15)** los extractos de suelos se sometieron a una etapa de *clean-up* antes de la derivatización con Fmoc. Para ello, se fortificaron con GLY y AMPA y se ajustó el pH del extracto a diferentes valores, entre 1 y 14 (**figura 3.16**), antes de pasarlos por el cartucho de Oasis HLB, el único que se probó en este caso. En este procedimiento, la derivatización se llevó a cabo sobre el extracto que pasó sin retenerse a través del cartucho. Se comprobó que el pH jugó un papel importante en los resultados finales, ya que afectó de forma notable a las señales finalmente obtenidas, mostrando mejores respuestas a pH 9 (**Figura 3 artículo científico 4**). En general, se buscaron las condiciones para las cuales se obtuvieron las señales más altas para GLY y AMPA, asumiendo que en dichas condiciones el ME (fuerte supresión de la ionización) fue menor.

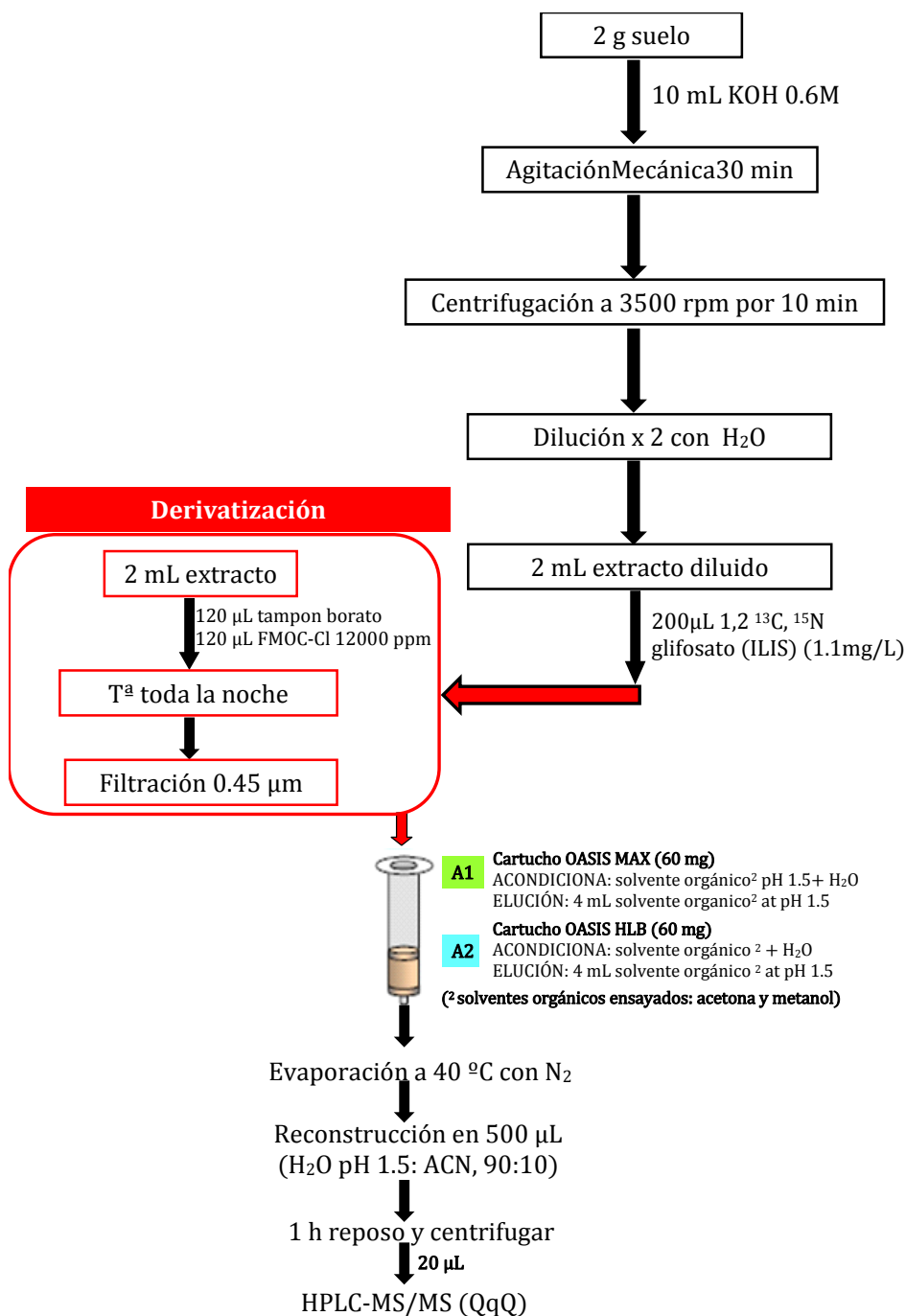


Figura 3.14. Procedimiento de *clean-up* aplicado, previa derivatización de GLY y AMPA con FMOCl, usando dos tipos de cartuchos de SPE (procedimiento A)

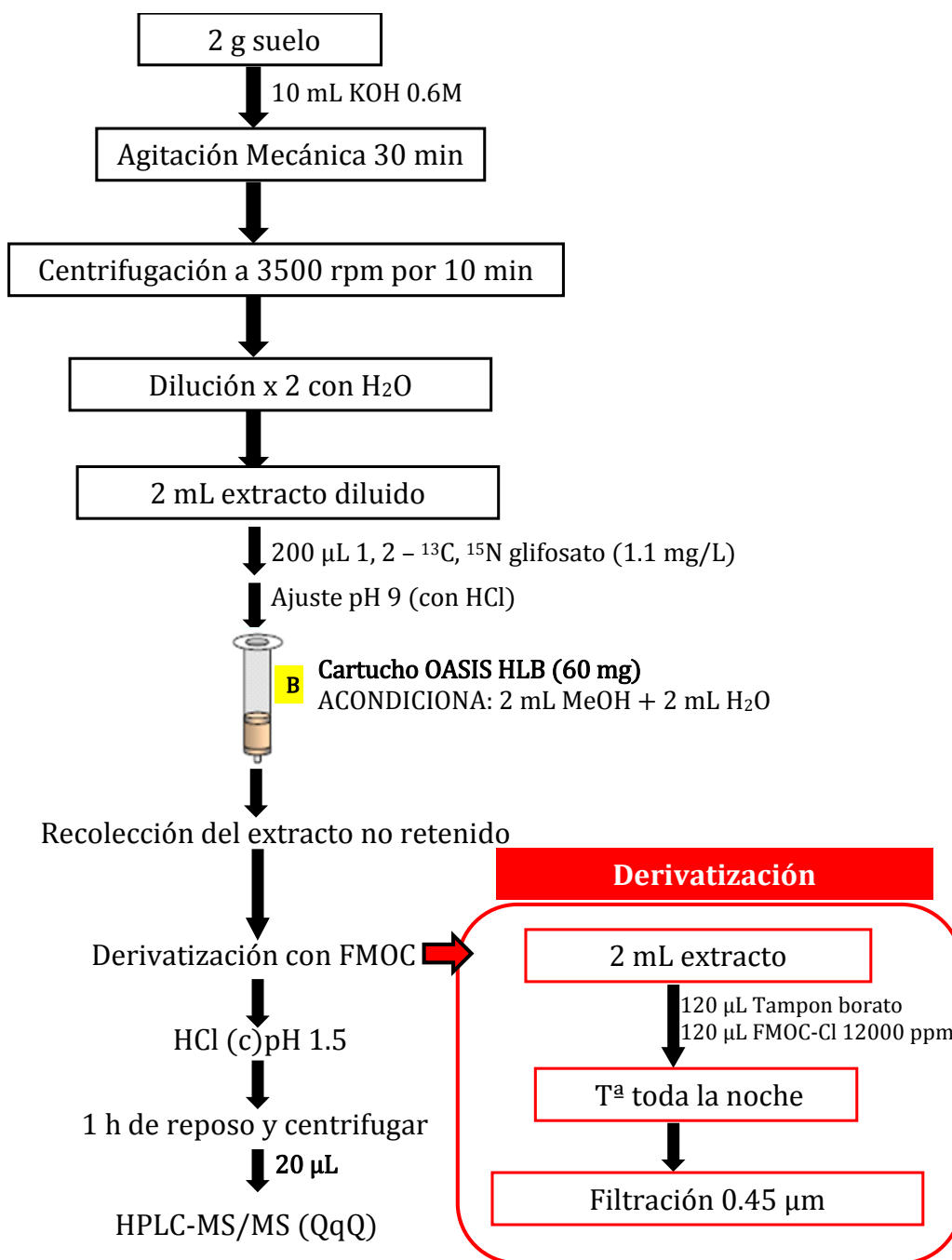


Figura 3.15. Procedimiento para determinar GLY y AMPA en suelos Colombianos y Argentinos, aplicando la etapa de *clean-up* antes de la derivatización con FMOC.

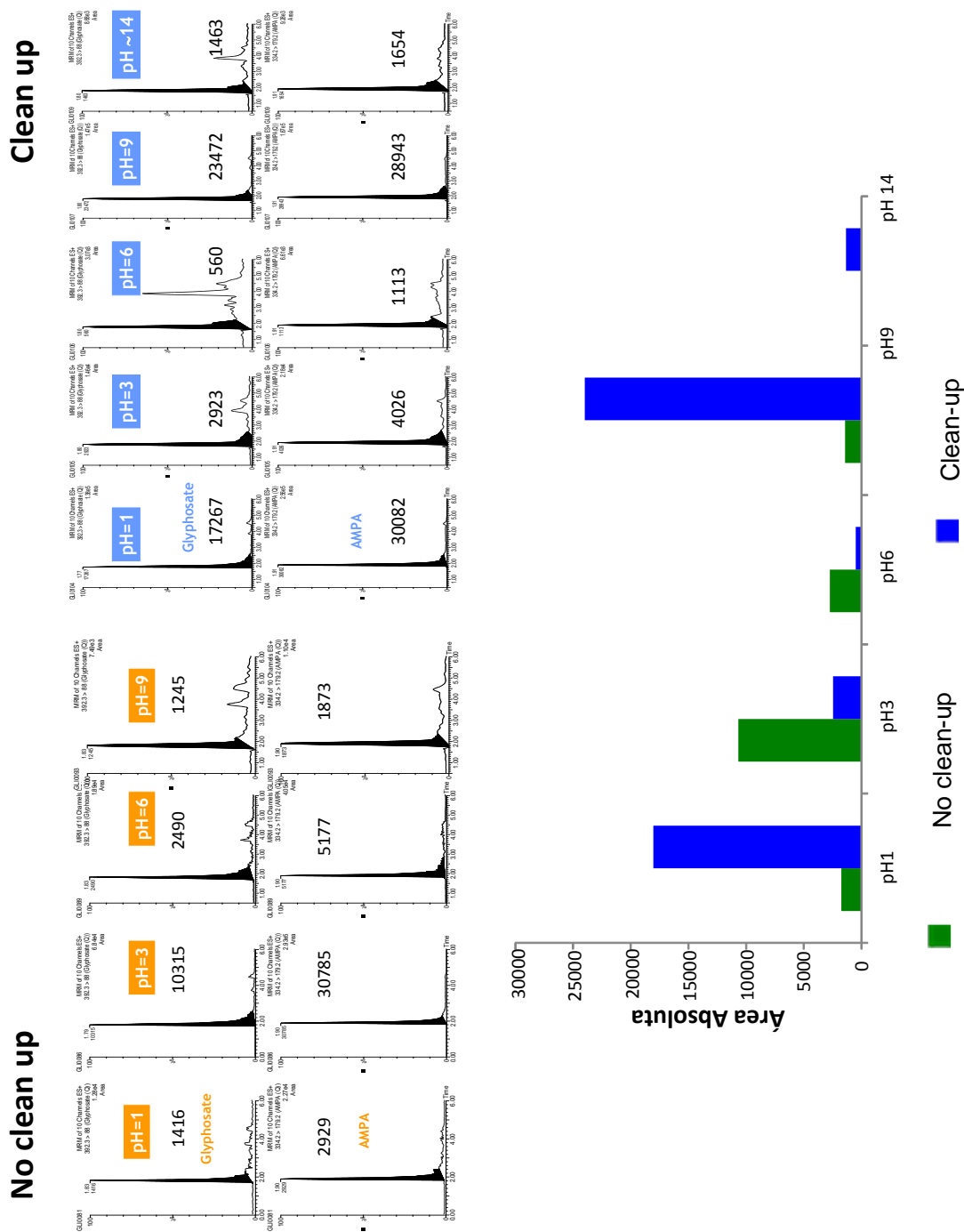


Figura 3.16 Respuesta para el glifosato, ajustando el pH del extracto a diferentes valores, antes y después de aplicar *clean-up* con Oasis HLB (suelo COL-001).

La metodología aplicada en el Procedimiento B fue la que finalmente se eligió para realizar el estudio de los suelos Colombianos y Argentinos. A pesar del *clean-up* aplicado, fue necesario usar patrón interno marcado para corregir el ME, que fue del orden del 25%, debido a la fuerte supresión de la ionización (supresión del orden del 75%). Tal como se ilustra en el procedimiento finalmente aplicado (Proced B), el ILIS se añadió al extracto del suelo antes de la SPE, con el fin de corregir no sólo el ME sino también algún tipo de pérdida potencial que pudiesen tener los analitos durante el tratamiento de muestra. Las recuperaciones obtenidas fueron satisfactorias, pero para la mayoría de las muestras se observaron formas de pico no muy buenas. Una dilución x 2 de los extractos alcalinos, antes de pasarlos por el cartucho de SPE, proporcionó mejores formas de pico, con una sensibilidad adecuada, y se escogió como compromiso entre sensibilidad, recuperación y forma de pico.

Se evaluó el ME para todos los suelos objeto de análisis, comparando la respuesta del ILIS en solvente y en extracto de suelo después de ser sometido a *clean-up*. A pesar de la etapa de purificación, en general aún se apreció una fuerte supresión de la señal, superior al 70% (es decir, ME 30%) para la mayoría de los suelos, confirmando una vez más la necesidad de usar el patrón interno marcado. Esto se puede apreciar con más detalle en ***supplementary information Tabla 2 (artículo científico 4)***.

En cuanto a las medidas mediante LC-MS/MS, se observó que varias de las transiciones seleccionadas estaban interferidas, lo cual podría afectar a la confirmación de positivos (ya que la interferencia afectaría a la relación Q/q ratio), pero también podría afectar a la cuantificación en el caso de que la transición interferida fuera la de cuantificación (Q), lo que originaría errores por exceso.

Las transiciones habitualmente interferidas en los suelos fueron las siguientes: para GLY 392.3→ 179.3 (q2); para AMPA 334.2→ 179.2 (Q); especialmente en los suelos de Colombia. En el ILIS hasta tres de las transiciones seleccionadas estaban también interferidas por los componentes de la matriz 395.3→ 173 (q1), 395.3→ 179.3 (q2), 395.3→ 217.1 (q3). En este caso no fue tan importante, pues solo afectaría a la confirmación del ILIS en las muestras, pero no a la cuantificación de los analitos. Como es bien sabido, el objetivo del ILIS es corregir el ME, por lo que solo se usa la transición de cuantificación (Q) para obtener las áreas relativas ($Q_{\text{analito}}/Q_{\text{ILIS}}$).

La interferencia de la transición q2 en el caso del GLY fue menos problemática, al existir tres transiciones para la confirmación, la cual fue posible utilizando hasta dos transiciones (q1 y q3). En el caso del AMPA, la interferencia afectó en algunos suelos a la transición de cuantificación (Q), lo cual resultó más problemático ya que podría afectar tanto a la cuantificación del compuesto como a su confirmación. El hecho de disponer solamente de dos transiciones para el AMPA, hizo que su determinación fuera más problemática.

Cabe destacar que el ion producto m/z 179 estuvo interferido en los tres compuestos (GLY, AMPA, ILIS). Este ion procede del FMOC (**figuras 3.11 y 3.12**) y por ello puede resultar más fácilmente interferido. En cualquier caso, en este trabajo se observó que la presencia de interferencias en la determinación de GLY en suelos de matriz compleja parece ser más frecuente de lo esperado, y por ello deben extremarse las precauciones para minimizar su efecto.

Se hizo un estudio de las interferencias observadas mediante medidas de masa exacta con un sistema LC-QTOF MS. En el **Artículo Científico 4** se realiza una discusión de la interferencia del ILIS, como ejemplo ilustrativo. El compuesto interferente presentó una masa exacta (395.0926) significativamente diferente (diferencia 69.8 mDa) de la masa exacta del ILIS-FMOC (395.1624). El ion producto 179 presentó la misma masa exacta que el del ILIS-FMOC y correspondió a C₄H₁₁ (m/z 179.0861), siendo generado por el FMOC. El fragmento m/z 173.0937 correspondió a la molécula protonada del interferente. Por lo tanto, se dedujo que este interferente debía tener algún grupo amino para reaccionar con el FMOC. Se intentó elucidar este compuesto desconocido encontrando una composición elemental C₆H₁₃N₄P pero no se encontró ninguna estructura química en las bases de datos utilizadas (Reaxys y ChemSpider) que fuera compatible con los iones fragmentos observados.

Del estudio realizado se deduce que es necesario adquirir todas las transiciones disponibles, y no solamente dos como es habitual en los métodos MS/MS, con el fin de evitar en lo posible las interferencias que pueden aparecer en ciertos tipos de suelos. En el **Artículo Científico 4, (Supplementary Information)** se comenta más con detalle el estudio realizado haciendo uso de QTOF.

Validación del método

Una vez optimizadas las condiciones de medida y el tratamiento de muestra, se procedió a la validación del método, haciendo uso de las guías SANCO vigentes en el momento de realizar dicho estudio (SANCO 10684/2009; SANCO 825/00).

El método se validó para cuatro suelos, dos Argentinos y dos Colombianos, siguiendo el método recomendado (**Figura 1, procedimiento B, artículo científico 4**). La validación se llevó a cabo mediante ensayos de recuperación fortificando dichos suelos a dos niveles de concentración (0.5 y 5.0 mg/kg), con cinco réplicas de cada uno. Debido a la ausencia de suelos “blanco” para poder validar el método y para preparar posteriores QCs, se trabajó con muestras que inevitablemente contenían los analitos, motivo por el cual se escogieron cuatro suelos diferentes intentando abordar distintas situaciones en lo relativo a niveles de concentración en el “blanco”. Para uno de estos (COL 001), no fue posible la validación al nivel bajo ya que la concentración de GLY y AMPA en este suelo era notablemente superior a ese nivel. En cualquier caso, la presencia de los analitos en los suelos a validar supuso un problema añadido en los cálculos de recuperación, al ser necesario restar la concentración del “blanco”, lo que pudo conllevar errores más altos de los habituales.

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en general, y se encontraron dentro de los aceptados en las guías SANCO, con la única excepción del AMPA, para el que se obtuvieron recuperaciones alrededor del 50% para los dos suelos de Colombia (**Tabla 2, artículo científico 4**). Las bajas recuperaciones para el AMPA demuestran que este compuesto fue particularmente problemático, por la presencia de interferentes, la mala forma de pico en algunos casos, y la usencia de su propio ILIS, ya que en este trabajo se hizo uso del ILIS del GLY para corregir ambos compuestos. El LOQ objetivo fue 0.5 mg/kg.

Análisis de muestras

El método validado se aplicó a 26 muestras de suelos de diferentes áreas agrícolas de Colombia (15) y Argentina (11). Para garantizar la calidad de los análisis se intercalaron entre las muestras varios QCs, pues esta es la mejor manera de proporcionar información realista y fiable sobre el funcionamiento del método. Se aceptaron recuperaciones entre el 60% y el 140%, al tratarse de valores individuales de recuperación, de acuerdo con la guía SANCO/10684/2009. En total, se usaron seis suelos para preparar los QCs a lo largo de los 4 meses de análisis de muestras, fortificándolos en cada caso a los dos niveles de validación.

Las recuperaciones de los QCs fueron satisfactorias en general, aunque de nuevo se apreciaron bajas recuperaciones a nivel bajo de fortificación para los QCs preparados con los suelos Colombianos, los cuales fueron particularmente problemáticos sobretodo para el AMPA, para el cual no se cumplía la relación Q/q ratio en varios de ellos.

La **Tabla 3, Artículo Científico 4**, muestra un resumen de los resultados obtenidos en los análisis. Ambos, GLY y AMPA, se encontraron en casi todas las muestras analizadas, alcanzado niveles de concentración notables, lo cual demuestra el amplio uso de este herbicida en ambos países. A modo de ejemplo en la **Figura 4 artículo científico 4**, se muestra los cromatogramas de los compuestos analizados en el suelo COL006.

Del total de la muestras analizadas (26), se detectaron ambos analitos en 23 de ellas. Las concentraciones fueron más altas en los suelos de Colombia. Así, el GLY se detectó en 13 de los 15 suelos colombianos, alcanzando un valor máximo de 3.8 mg/kg, siendo su concentración superior a 1 mg/kg en nueve de ellos. En cuanto al AMPA, se detectó también en 13 suelos de Colombia, pero a menor concentración, con un valor máximo de 2.1 mg/kg y con tres muestras por encima de 1 mg/kg. Los niveles en los suelos argentinos estuvieron por debajo que las encontradas en los suelos Colombianos, con sólo dos excepciones para el AMPA (ARG003 y ARG004) que fueron de 1.0 y 1.2 mg/kg, respectivamente.

Los positivos encontrados se confirmaron usando al menos dos transiciones MS/MS y la relación Q/q, con tolerancias máximas en las desviaciones con respecto al patrón de referencia entre $\pm 20\%$ y $\pm 50\%$, dependiendo del valor de Q/q (SANCO/16884/2009). Además, para confirmar un positivo fue necesario que su tiempo de retención estuviera

dentro del $\pm 2.5\%$ comparado con el patrón de referencia. Las transiciones utilizadas para la confirmación de positivos de GLY fueron: Q/q1 (relación iónica $2.6, \pm 25\%$ de tolerancia en la desviación), y Q/q3 (relación iónica $1.9, \pm 20\%$ de tolerancia en la desviación). La Q/q2 no se utilizó para la confirmación, ya que estaba interferida en varias de las muestras.

La confirmación del GLY en los suelos Argentinos fue más complicada, ya que la transición Q/q1 parecía estar interferida en 6 de las 10 muestras positivas. Por ello, se hizo uso de la transición Q/q3, lo que permitió una confirmación fiable en todas las muestras. Finalmente, el GLY pudo ser confirmado en todos los suelos en los que se detectó.

La situación del AMPA fue más problemática en términos de confirmación, ya que sólo estaban disponibles dos transiciones, y una de ellas (la de cuantificación; $334 \rightarrow 179$) parecía estar interferida en la mayoría de las muestras. El hecho de que la transición utilizada para la cuantificación del AMPA fuera la interferida, dificultó en gran medida los análisis. Por ello, los suelos que se encontraban fuera de tolerancia en cuanto a la relación iónica fueron re-cuantificados utilizando la transición menos sensible, pero más selectiva ($334 \rightarrow 112$). Las concentraciones para el AMPA fueron inferiores a las resultantes con la transición más sensible ($334 \rightarrow 179$), pero que parecía estar interferida (**Tabla 3 artículo científico 4**).

En nuestro trabajo se sugiere aumentar la tolerancia en la relación Q/q hasta $\pm 50\%$, como valor más realista en este tipo de análisis, en lugar de la utilizada de acuerdo con el valor de Q/q ($\pm 25\%$). Si este fuese el caso, 8 de los 9 suelos que habían quedado fuera de tolerancia para el AMPA, serían ahora confirmados. Este aumento en la tolerancia de las relaciones iónicas ha sido también sugerido en la literatura científica (Cervera, 2012; Mol, 2012; Portolés, 2011). De hecho, en la nueva versión de la guía SANCO publicada después de haber publicado este artículo se modificó el criterio de tolerancia en la Q/q ratio para fines de confirmación, pasando a un valor único de $\pm 30\%$, independiente de la relación Q/q (SANCO/12571/ 2013).

En las **figuras 3.17 y 3.18** se muestran cromatogramas ilustrativos de positivos encontrados en suelos provenientes de Argentina y Colombia

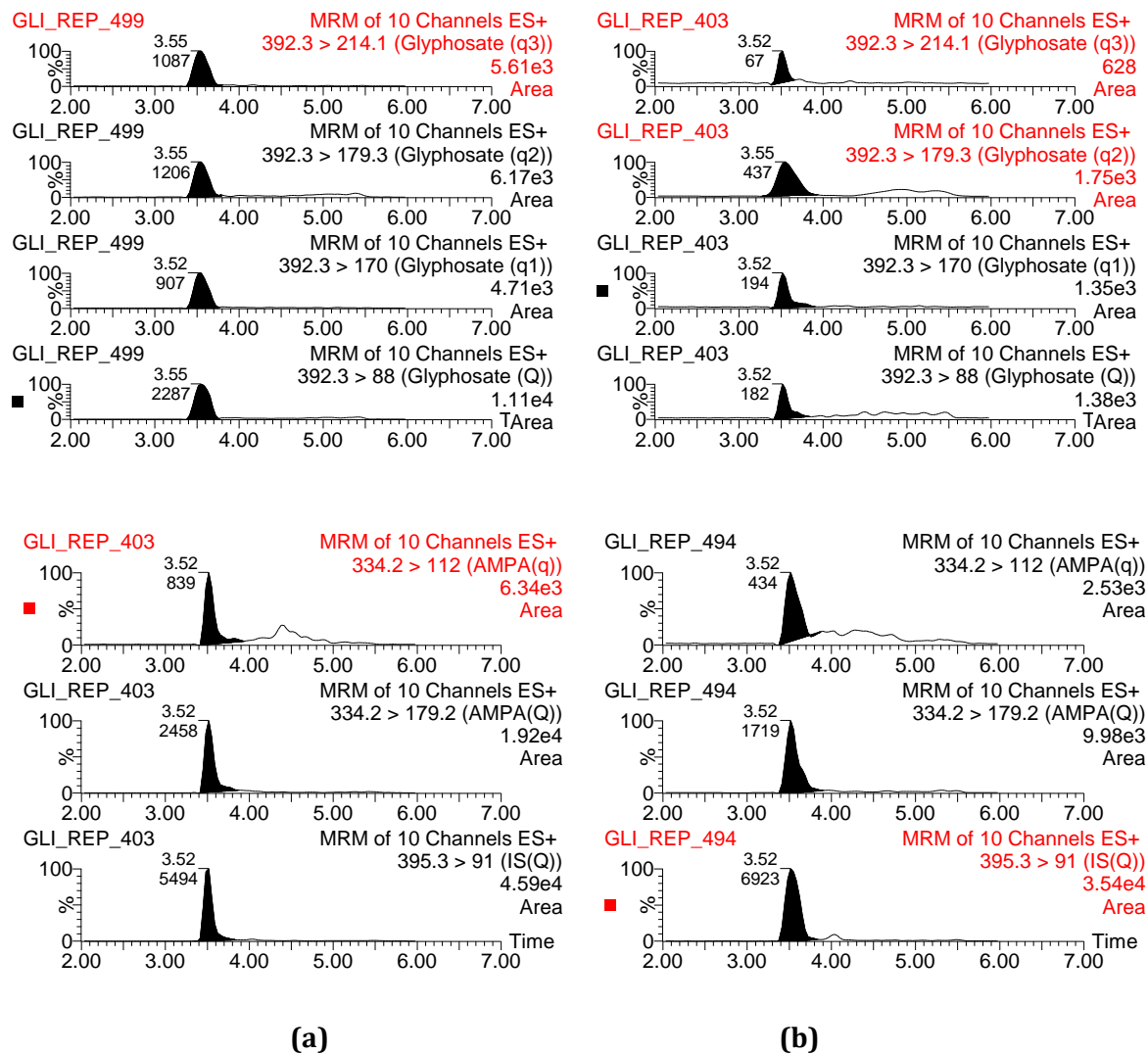


Figura 3.17 Cromatogramas LC-MS/MS obtenidos para glifosato (parte superior) y AMPA (parte inferior) en dos suelos Argentinos (a) ARG005, (b) ARG008.

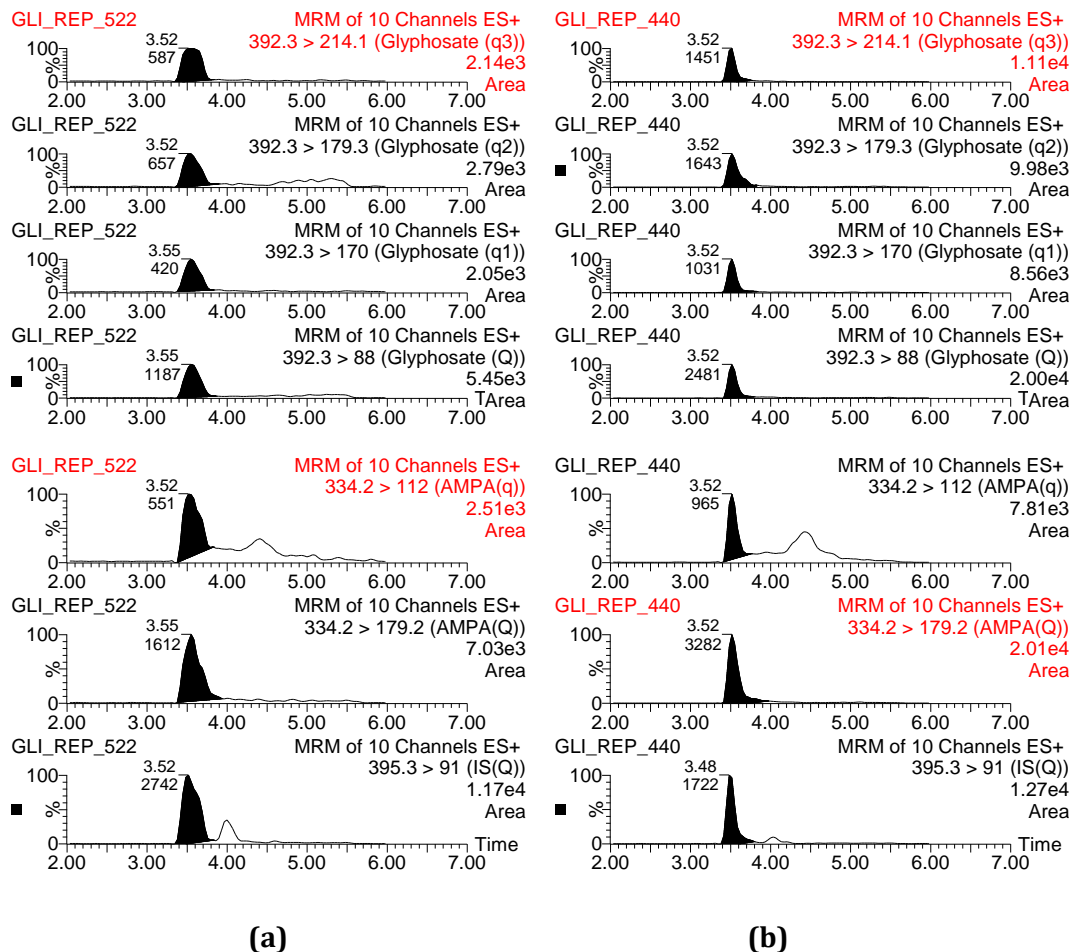


Figura 3.18 Cromatogramas LC-MS/MS obtenidos para glifosato (superior) y AMPA (inferior) en dos suelos Colombianos (a) COL013, (b) COL014.

A la vista de nuestros resultados, parece evidente que la determinación de AMPA es especialmente problemática. Para poder realizar una adecuada determinación de AMPA en estos suelos "difíciles" se sugiere el siguiente enfoque: (1) realizar los análisis usando la transición más sensible (334→ 179); (2) calcular la relación Q/q y comprobar si se ajusta a las desviaciones máximas aceptadas (en el trabajo $\pm 25\%$, y actualmente, con la revisión de la guía SANCO, $\pm 30\%$); en caso afirmativo, aceptar el valor de la concentración obtenida; (3) si

la relación iónica está fuera de tolerancia, calcular la concentración de AMPA con la transición menos sensible, pero más selectiva (334→ 112).

El trabajo realizado muestra las dificultades asociadas a la determinación de residuos de GLY y AMPA en suelos como los analizados de Sur América, Las peculiares características del GLY y AMPA hacen que la determinación en este tipo de suelos sea muy complicada, observándose un fuerte ME con notable supresión de la señal, además de la interferencia de varias de las transiciones adquiridas para los analitos por compuestos presentes en la matriz. Por último, se hace necesaria la adquisición de todas las transiciones MS/MS para tener la posibilidad de cuantificar y confirmar con más opciones, evitando en lo posible los interferentes ya que, a pesar de la etapa de purificación, no es posible eliminar todos los componentes de la matriz.

3.3.1 Artículo Científico 5

Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean.

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*

Journal of Chromatography A. (2013) 1313:157-165.

Journal of Chromatography A, 1313 (2013) 157–165



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean



A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón 12071, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 May 2013
Received in revised form 4 July 2013
Accepted 9 July 2013
Available online 12 July 2013

Keywords:
Glyphosate residues
LC–MS/MS
Obelisc N
Maize
Rice
Soybean

ABSTRACT

The residue determination of the widely used herbicide glyphosate (GLY) is highly problematic due to its amphoteric character, low mass and lack of chemical groups that might facilitate its detection. Most methods developed up to now have employed pre-column or post-column derivatization to form fluorescent derivatives and/or to reduce the polar character of the analyte facilitating its chromatographic retention. The aim of this work is to evaluate the feasibility of performing the direct LC–MS/MS determination of GLY residues in vegetables. After testing several Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) columns, Obelisc N was selected due to its better chromatographic retention. LC–MS/MS determination has been performed in negative ionization mode, monitoring up to four transitions to give high reliability to the identification/confirmation process. This approach has been evaluated for the determination of GLY residues in rice, maize and soybean samples, and the method validated at different concentrations in compliance with the maximum residue limits established in the current legislation. After sample extraction with water, a combination of extract dilution, partition with dichloromethane, and solid phase extraction (SPE) using Oasis HLB cartridges (depending on the sample matrix under analysis) was applied. Quantification was made by using isotope-labeled GLY as internal standard and calibration in solvent. The methodology developed allows the rapid determination of GLY residues avoiding the derivatization step typically applied for this herbicide. The most critical issue is the robustness of the Obelisc N column, which was found to suffer rapid degradation with time. Extreme care and continuous testing of retention times and peak shapes is required for a reliable determination.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glyphosate (GLY) is claimed to be the world's biggest selling herbicide. The determination of this compound at low residue levels is very difficult due to its amphoteric character, low mass and lack of chemical groups that might facilitate its detection. For this reason, most methods developed until now, have employed pre-column or post-column derivatization (mostly pre-column using 9-fluorenylmethoxycarbonyl, FMOC) to form fluorescent derivatives (e.g. former methods based on liquid chromatography with fluorescent detection) and/or to reduce the polar character of the analyte facilitating its chromatographic retention (e.g. most recent methods based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry).

Analytical methods developed for analysis of glyphosate in vegetables have been usually based on HPLC with fluorescence detection [1–5]. These methods are time consuming and, in addition to the derivatization step, most of them require a

clean-up step, e.g. on resin columns. The use of column-switching (coupled-column) chromatography (LC–LC) allowed minimization of sample manipulation, although more complicated chromatographic systems with two analytical columns were required. This configuration was successfully applied for GLY and its main metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) residue determination in soils, water and vegetable samples [5–8]. The maturity of tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC–MS/MS) has led to the withdrawal of previous methods using conventional detection systems. LC–MS/MS is shown nowadays as the preferred technique for polar pesticides due to its excellent sensitivity and selectivity under selected reaction monitoring (SRM) mode. Thus, glyphosate residues have been determined in a variety of environmental and food matrices by LC–MS/MS after derivatization with FMOC [9–15]. The direct determination of GLY in the most widely used reversed-phase chromatographic columns seems problematic due to its poor retention. Thus, an LC–MS/MS method has been reported for soybean using a Zorbax Eclipse RDB C8 150 mm × 4.6 mm analytical column, where GLY retention time was very low (0.88 min), eluting at the void volume [16]. To improve chromatographic retention the use of ion chromatography is an option that has been applied for GLY residue determination in

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@uji.es (F. Hernández).

Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean.

Journal of Chromatography A.1313 (2013)157-165.

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellon 12071, Spain

ABSTRACT

The residue determination of glyphosate (GLY) -one of world's most widely used herbicides- is highly problematic due to its amphoteric character, low mass and the lack of chemical groups that might facilitate its detection. Most methods developed up to now have employed pre-column or post-column derivatization (mostly pre-column using FMOc) to form fluorescent derivatives and/or to reduce the polar character of the analyte facilitating its chromatographic retention. The aim of this work is to evaluate the feasibility of performing the direct LC-MS/MS determination of GLY residues in vegetables based on the use of chromatographic columns able to retain this compound. Several Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) columns were tested, although none of them provided satisfactory results. Finally, Obelisc N (an innovative silica-based stationary phase which has anion groups close to the silica surface separated from cationic groups in the periphery by a hydrophilic chain) was selected due to its better chromatographic retention. LC-MS/MS determination has been performed in negative ionization mode, monitoring up to four transitions to give high reliability to the identification/confirmation process thereby minimizing the possibility of reporting false positives/negatives. The use of Obelisc N has been evaluated for the determination of GLY residues in rice, maize and soybean samples, and the method validated at different concentrations in compliance with the maximum residue limits established in the current European legislation. After sample extraction with water, a combination of dilution with ultrapure water, partition with dichloromethane, and SPE using Oasis HLB cartridges (depending on the sample matrix under analysis) was applied. Quantification was made by using isotope-labeled GLY as internal standard and calibration in solvent. The methodology developed allows the rapid determination of GLY residues in the vegetable matrices tested and requires little sample manipulation, avoiding the use of the derivatization step typically applied for this herbicide. The most critical issue is the

robustness of the column used (Obelisc N), which was found to suffer rapid degradation with time. Extreme care and continuous testing of retention times and peak shapes with reference standards is required for a reliable determination

Keywords: Glyphosate residues, LC-MS/MS, HILIC, Obelisc N, maize, rice, soybean.

INTRODUCTION

Glyphosate (GLY) is claimed to be the world's biggest selling herbicide. The determination of this compound at low residue levels is very difficult due to its amphoteric character, low mass and lack of chemical groups that might facilitate its detection. For this reason, most methods developed until now, have employed pre-column or post-column derivatization (mostly pre-column using FMOC) to form fluorescent derivatives (e.g. former methods based on liquid chromatography with fluorescent detection) and/or to reduce the polar character of the analyte facilitating its chromatographic retention (e.g. most recent methods based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry).

Analytical methods developed for analysis of glyphosate in vegetables have been usually based on HPLC with fluorescence detection [1-5]. These methods are time consuming and, in addition to the derivatization step, most of them require a clean-up step, e.g. on resin columns. The use of column-switching (coupled-column) chromatography (LC-LC) allowed minimization of sample manipulation, although more complicated chromatographic systems with two analytical columns were required. This configuration was successfully applied for GLY and its main metabolite AMPA residue determination in soils, water and vegetable samples [5-8]. The maturity of tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS/MS) has led to the withdrawal of previous methods using conventional detection systems. LC-MS/MS is shown nowadays as the preferred technique for polar pesticides due to its excellent sensitivity and selectivity under selected reaction monitoring (SRM) mode. Thus, glyphosate residues have been determined in a variety of environmental and food matrices by LC-MS/MS after derivatization with FMOC [9-15]. The direct determination of GLY in the most widely used reversed-phase chromatographic columns seems problematic due to its poor retention. Thus, an LC-MS/MS method has been reported for soybean using a Zorbax Eclipse RDB C8 150x4.6 mm analytical column, where GLY retention time was very low (0.88

min), eluting at the void volume [16]. To improve chromatographic retention the use of ion chromatography is an option that has been applied for GLY residue determination in cereals. After extraction with water and on-line clean-up before anion exchange chromatography separation, GLY has been determined without any derivatization in both positive [17] and negative ionization modes [18] using 10 mM phosphoric acid (pH 2) and 30 mM NaHCO₃ (pH 8.2) as eluents, respectively.

The EU reference laboratories for residues of pesticides suggest a rapid method for the direct determination of GLY in fruits and vegetables using anion exchange chromatography (Dionex Ion Pac AS 11) coupled to MS/MS under ESI negative mode [19]. However, not much has been published in scientific literature using this methodology, maybe because the coupling of ionic chromatography (IC) with MS is always problematic due to the common incompatibility of mobile phase buffers used in IC with MS.

The use of HILIC is a promising approach for the analysis of highly hydrophilic polar compounds [20]; therefore, it might be expected that HILIC facilitates the determination of GLY without the need of derivatization. Several attempts have been made for direct GLY residue determination using HILIC. Thus, after extraction with water, the herbicides glyphosate and glufosinate have been determined in fruits and vegetables by silica-based Venusil HILIC with diode array and MS/MS detection, using as mobile phase water (0.1% formic acid) : acetonitrile 99:1 [21]. Another recent option has been the use of a mixed mode hydrophilic interaction/weak anionic exchange (HILIC-WAX) coupled to MS/MS, which has been used for the determination of GLY and AMPA in fruits and vegetables [22,23].

After a literature review, it seems clear that a general consensus exists on the use of FMOc for GLY determination in pre-column derivatization-based methods. However, there is no such consensus on the conditions and columns used for the direct determination of glyphosate. The robustness of the methods is also questionable in most cases in the light of the literature reported. The goal of this work is to explore the feasibility of performing the direct determination of GLY in rice, maize and soybean by LC-MS/MS with a triple quadrupole instrument, avoiding the derivatization step commonly applied for this herbicide. After testing several HILIC and Obelisc columns, Obelisc N, which has been previously used for determination of GLY and its major metabolites in human serum [24] was selected and the method optimized for the rapid determination of GLY residues in vegetables.

EXPERIMENTAL

Reagents and chemicals

Glyphosate (98%) and isotope-labeled glyphosate (1,2-¹³C, ¹⁵N) reference standards were purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Formic acid (HCOOH), acetic acid (HAc), ammonium formate (NH₄Fm) and ammonium acetate (NH₄Ac) as well as LC-grade acetonitrile and dichloromethane were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained from a MilliQ water purification system (Millipore Ltd, Bedford, MA, USA).

Standard stock solution was prepared dissolving approximately 50 mg powder, accurately weighted, in 100 mL of water obtaining a final concentration of approximately 500 mg/L. Standard working solutions for LC-MS/MS analysis and for samples fortification were prepared by dilution with water. A solution 500 mM ammonium formate/formic acid (pH 3.8) was prepared as follows: 3.15 g ammonium formate were dissolved in water, and 1.9 mL formic acid was added, and the solution was adjusted to 100 mL with water. The isotope-labeled glyphosate used as internal standard (ILIS) was purchased as 1.1 mL of 100 µg/mL stock solution in water. An 11 µg/mL ILIS solution was prepared by dissolving 1.1 mL of the stock solution in 10 mL of water. ILIS working solutions were prepared by diluting the intermediate standard solution with water. OASIS HLB cartridges (60 mg) were purchased from Waters (Mildford, MA, USA).

The chromatographic columns tested were: Waters Acquity UPLC BEH amide (1.7 µm, 2.1 x 100 mm); Waters Acquity UPLC BEH HILIC (1.7 µm 2.1 x 100 mm); SIELC Obelisc R (5 µm, 2.1 x 100 mm, 100 Å); SIELC Obelisc N (5 µm, 2.1 x 100 mm, 100 Å)

Instrumentation

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC™) system Acquity (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a TQD triple quadrupole mass spectrometer (Waters Micromass, Manchester, UK) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface, in negative ionization mode. The LC separation was performed using an Obelisc N 5µm 2.1 x 100 mm (Sielc Technologies, Prospect Heights, IL, USA), at a flow rate of 200 µL/min. Mobile phase was water/ACN (80:20), both 0.1% HCOOH. The injection volume was 50 µL. Drying as well as nebulizing gas was nitrogen, obtained from a nitrogen generator. The gas flow was set to 650L/h. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately 2.10^{-3} mbar in the collision cell. A capillary voltage of 3.0 kV was applied. The desolvation gas temperature was set to 350°C and the source temperature to 150°C. Temperature column was set to 40°C. Dwell times of 0.05 s/transition were chosen. MassLynx v 4.1 (Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

The higher sensitivity needed for determination of glyphosate at the lowest spiked level, required the use of a more sensitive instrument. So, for experiments at the low spiked level, a TQS analyzer was used (Waters Micromass Manchester, UK). The instrumental conditions were similar to those of TQD.

Sample Preparation

Rice samples:

2.0 g rice sample (previously homogenized and dried at room temperature) was left in contact with 20 mL of HPLC-grade water overnight at room temperature. After extraction in ultrasonic bath for 30 min, the sample was centrifuged at 4600 rpm for 10 min. Then, 500µL of the supernatant were 2-fold diluted by adding 500µL of HPLC-grade water. A scheme of the procedure applied is depicted in Fig. 1.

Maize and soybean samples:

2.0 g sample (previously homogenized and dried at room temperature) were extracted with 20 mL of HPLC-grade water and 5 mL of DCM by ultrasounds for 30 min. After centrifuging the samples at 4600 rpm for 10 min, 2 mL of the aqueous supernatant were passed through Oasis HLB cartridges (60 mg), previously conditioned with 2 mL MeOH and 2 mL water. In the case of maize, 500 μ L of the non- retained extract was 2-fold diluted by adding 500 μ L HPLC-grade water (see Fig. 1). For soybean, 1 mL of the non-retained sample extract was collected and 2-fold diluted with 1 mL ACN. After keeping the diluted extract in the freezer at -18°C during 2 h, it was centrifuged at 12.000 rpm for 10 min. A 200 μ L supernatant aliquot was taken and it was 5-fold diluted adding 800 μ L water (see Fig. 1).

Finally, 50 μ L of 2 μ g/mL ILIS solution was added to 1 mL of the diluted sample extract together with 10 μ L of 1000 mM $\text{NH}_4\text{Fm}/\text{HCOOH}$ buffer (pH 3.8), and it was injected into the LC-ESI-MS/MS system under the chromatographic and MS conditions indicated in Instrumentation and Table 1, respectively. For the calibration curve, 50 μ L of 2 μ g/mL ILIS solution was added to 1 mL of the corresponding reference standard in solvent together with 10 μ L of 1000 mM $\text{NH}_4\text{Fm}/\text{HCOOH}$ buffer (pH 3.8).

Table 1. Optimized MS/MS parameters for GLY and ILIS

COMPOUND	PRECURSOR ION	CONE VOLTAGE (V)	PRODUCT ION	COLLISION ENERGY (eV)	ION RATIO (Q/q)
GLYPHOSATE (GLY)	167.8	20	149.9 (Q)	10	-
			62.9 (q1)*	20	3.2
			124.0 (q2)	10	3.3
			78.7 (q3)	20	12.9
ILIS	171.0	20	153.0 (Q)	10	-

*The product ion 62.9 is an alternative transition that can be used for quantification in complex matrix samples due to its higher specificity.

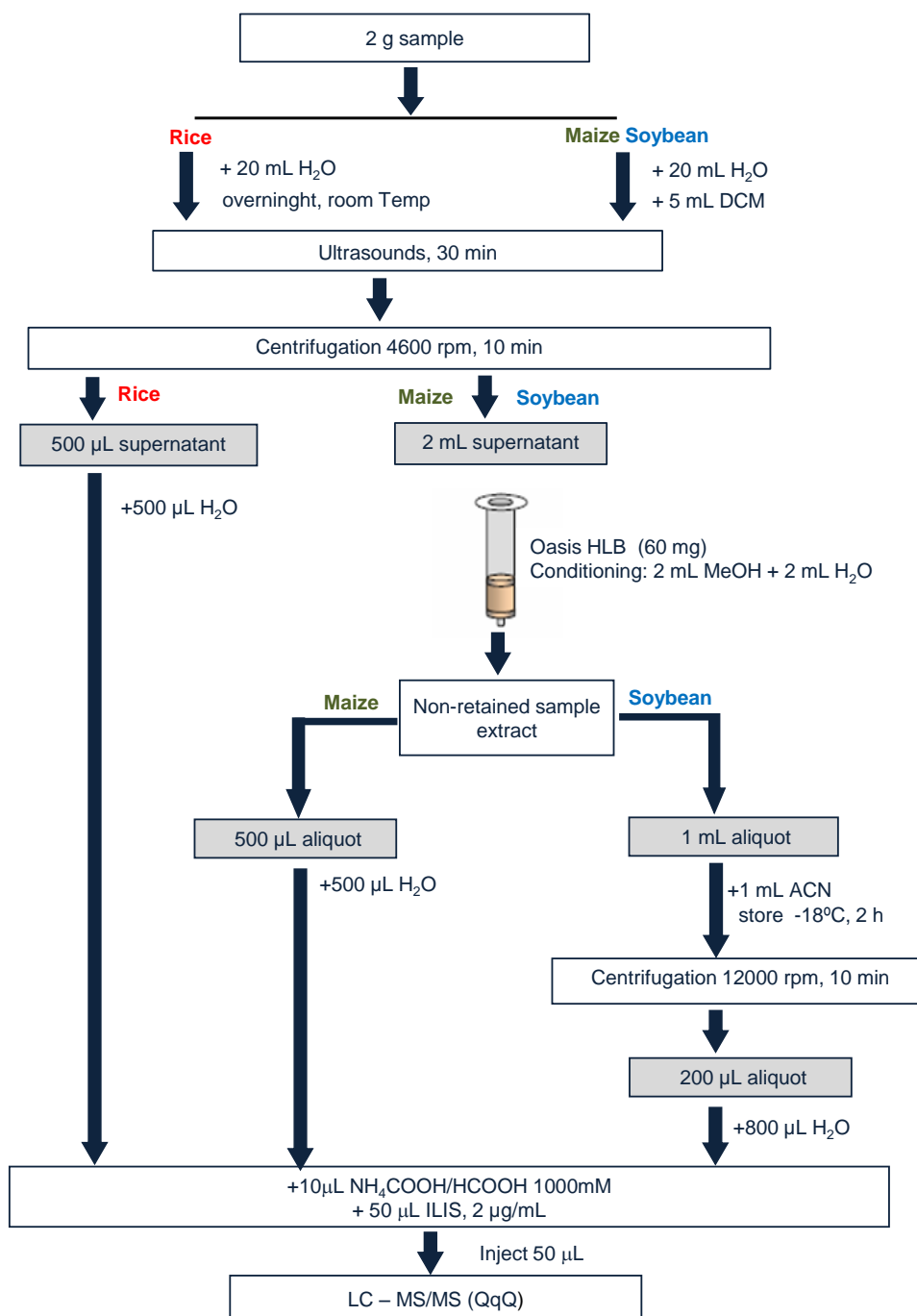


Fig. 1. Scheme of the procedure applied for rice, maize and soybean samples.

RESULTS AND DISCUSSION

MS optimization

Full-scan MS and product-ion MS/MS spectra of GLY were recorded in both positive and negative electrospray ionization modes from a 5 mg/L reference standard solution. The best results in terms of sensitivity performance were obtained in negative mode. The negative-ion electrospray full scan spectrum at a cone of 20 V showed a peak at m/z 167.8 corresponding to the deprotonated molecule $[M-H]^-$. The MS/MS spectra at 10 eV showed abundant product ions at m/z 149.9 and 124.0, corresponding to losses of water and formic acid, respectively. When increasing the collision energy at 15 eV, a product ion at m/z 80.9 was observed, corresponding to $H_2PO_3^-$. Other product ions, at m/z 78.7 and 62.9, were found at 20 eV, corresponding to PO_3^- and PO_2^- , respectively [25]. In order to favor sensitivity, the selected reaction monitoring (SRM) transition 167.8→149.9 was selected for quantification. The low selectivity of this transition (loss of water), could make the presence of visible interferences more likely; therefore, an alternative quantitative transition for problematic matrices could be 167.8 → 62.9, due to its higher selectivity and better S/N ratio. The optimized MS/MS parameters are shown in **Table 1**, where it can be seen that up to three transitions were available for confirmation purposes. The product ion m/z 78.7 was the most problematic to be used in low-analyte level samples because of its low abundance (see the high Q/q ratio observed for this transition in **Table 1**).

Chromatography optimization

In this work, four chromatographic columns have been tested: two HILIC columns (BEH amide, BEH HILIC) and two Obelisc columns (Obelisc R, Obelisc N).

Firstly, Waters Acquity UPLC BEH amide and Waters Acquity UPLC BEH HILIC were tested. Several water : ACN mobile phases were checked in different compositions. The effect of adding formic acid and NH_4Ac in the aqueous phase was also tested. However, very poor retention, unsatisfactory peak shape and/or poor sensitivity were observed, discarding the use of these columns for subsequent experiments.

Afterwards Obelisc R and Obelisc N, both from Sielc Technologies, were tested. Both are zwitterionic-type mixed-mode phases with either reversed-phase or normal-phase characteristics [26]. Obelisc R has cationic groups close to the silica surface separated from

anionic groups by a hydrophobic chain. It was tested using water : ACN as mobile-phase and 0.1% formic acid, but no chromatographic peak was observed with this column. Therefore, we directed our work to Sielc Obelisc N. This column has anion groups close to the silica surface that are separated from the cationic groups in the periphery by a hydrophilic chain. The exact chemical nature of the zwitterions is not specified by the manufacturer. Its stability is limited to a pH range of 2.5-4.5 and a temperature range of 20-45 °C [27]. Using the mobile phase recommended by the manufacturer water : ACN (30:70), both 20 mM NH_4Fm [28], and injecting the analyte in 100% water, GLY eluted at 1.5 min, with an irregular peak shape. Different percentages of water : ACN in the sample vial were tested (100:0; 50:50, 20:80) under different pH conditions: 0.5 % HCOOH (pH around 2.5, 5 mM buffer NH_4Fm / HCOOH (pH 3.8), and 5 mM $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ (pH 4.8). without satisfactory results (**Figure 2, top**).

As chromatographic retention was still unsatisfactory, the mobile phase composition was changed to water : ACN (80:20), both 0.1 % HCOOH , based on the conditions reported for the determination of GLY in human serum samples [24]. Under these conditions, GLY retention time increased up to 5.1 min. GLY was injected under different conditions in the sample vial, using several mixtures water : ACN 100:0; 80:20, 50:50, 20:80) and different pH conditions: 0.5 % HCOOH (pH around 2.5), 5 mM buffer NH_4Fm / HCOOH (pH 3.8), and 5 mM $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ (pH 4.8). No significant differences were observed as a function of the water: ACN percentage in the sample vial; however, the peak shape was poorer, with a notable peak broadening when using 0.5% HCOOH . The use of buffer ammonium formate/formic or ammonium acetate/acetic was beneficial, and both provided satisfactory retention and peak shape (**Figure 2, bottom**).

Finally, the optimum conditions were established as isocratic elution with water : acetonitrile (80:20), both 0.1% HCOOH . The sample extract was injected in a 100% aqueous media containing 5 mM NH_4Fm / HCOOH (pH 3.8). Different injection volumes were tested. The best results were obtained with 50 μL , as it gave the highest sensitivity without negatively affecting the peak shape.

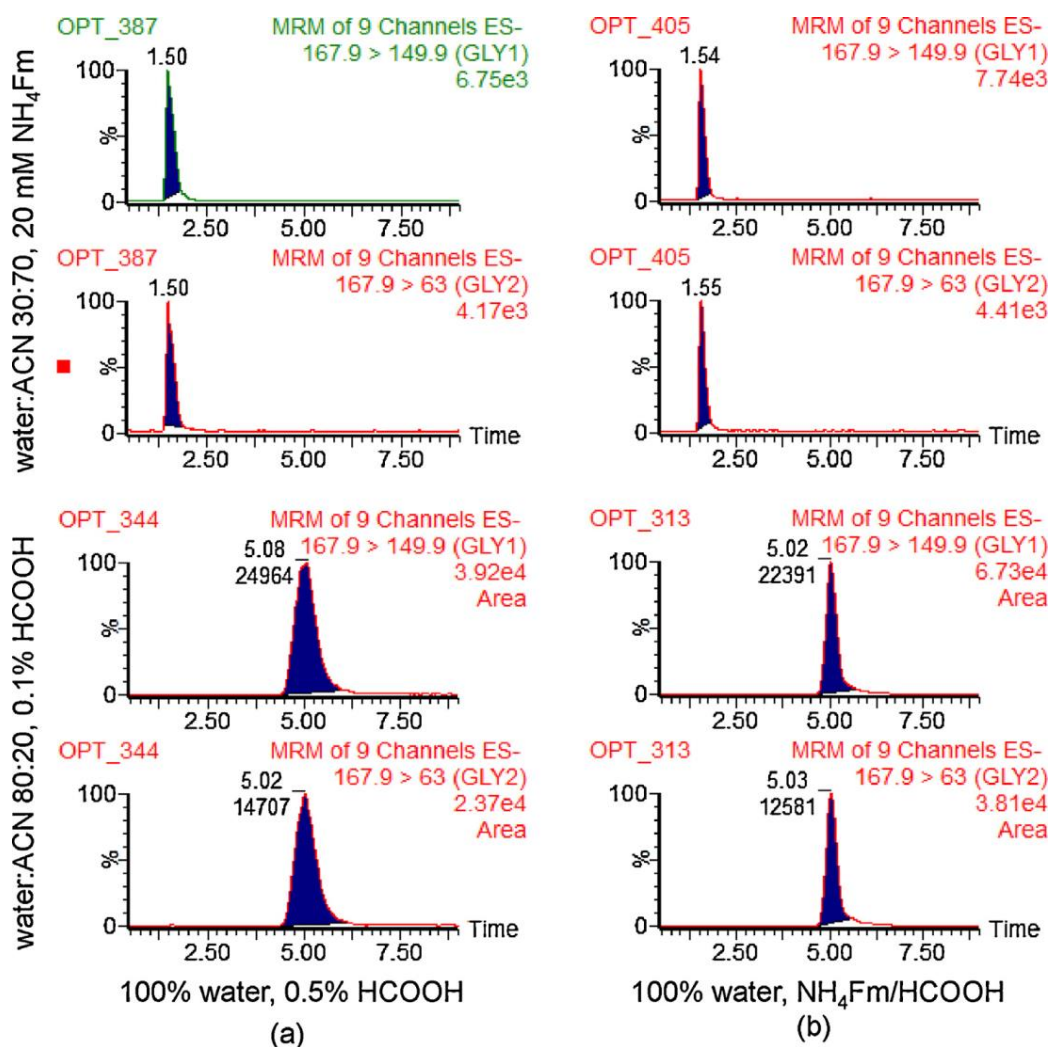


Fig 2. Effect of additives in the sample vial with two mobile phases tested. Top: mobile phase water:ACN 30:70, 20 mM NH₄COOH; Bottom: mobile phase water:ACN 80:20, 0.1% HCOOH; a) sample vial 100% water, 0.5% HCOOH; b) sample vial 100% water, 5mM NH₄COOH/HCOOH (pH 3.8).

Sample treatment optimization and matrix effects

In this work, matrix effects (%ME) in the different sample treatments tested were calculated as the response of the analyte in matrix divided by the response of the analyte (at the same concentration) in solvent. Thus, a value of 100% means that no matrix effect is present. In all experiments performed, matrix effects, when observed, always led to ionization suppression.

Rice Samples

Initially, 3 extraction procedures using water as extractant were studied in rice fortified at 1 mg/kg: (i) mechanically shaking (1 hour); (ii) ultrasonic treatment (30 min); and (iii) use of an Ultra-Turrax mixer (5 min). When the crude extract was injected, absolute recoveries were satisfactory in all cases (between 70-100%), because matrix effects were not very severe (around 70-80% depending on the extraction procedure applied).

Despite this fact, the dilution of the rice extract with HPLC-grade water was assayed as a fast, simple and effective way to minimize matrix content, and to protect the Obelisc column by avoiding the injection of concentrated extracts. Although a five-fold dilution factor led to more accurate quantification, as matrix effects were practically absent, a dilution factor x2 was finally selected as a compromise, as it led to better sensitivity with a negligible matrix effect.

According to literature, it is important to hydrate the rice with water overnight [5]. We tested the effect of maintaining spiked samples in contact with water both 1 hour and overnight, obtaining an increase in recovery from 77% to 95%, when rice was hydrated overnight. In addition, and trying to evaluate the potential bonding of GLY in incurred samples, rice samples were spiked at 1 mg/kg and allowed to stand for 1, 12 and 24 hrs (overnight) before extraction with water. Recoveries of 95%, 94% and 98% were obtained, respectively, showing that after 24 hrs no irreversible bonding of GLY occurred. Thus, during the method validation, the blank samples were spiked and left to stand for just one hour in order to make the method more practical and rapid. The sample procedure finally selected for rice samples included addition of water to rice, left to stand for at least 12 hours and extraction with ultrasounds for 30 minutes.

Maize Samples

The severe matrix effects (around 5%) and poor reproducibility observed encouraged us to include a clean-up step for this type of samples. A liquid-liquid partition with dichloromethane was tested as a simple way to remove non-ionic low to medium water solubility matrix components such as lipids [14]. Recoveries slightly improved, but the matrix effect was still very important (around 15%). Therefore, we added a solid phase extraction (SPE) clean-up to minimize the strong interferences and to increase the GLY MS response. Using Oasis HLB as sorbent when loading the extract, GLY is expected to pass through the cartridge without being retained, while some matrix components will be retained into the Oasis HLB cartridge [15]. After DCM partition and SPE clean-up, matrix effects notably decreased, but were still significant (around 30%; see Figure 3). Again, the dilution of the extract was tested as a way to minimize the remaining matrix effect. According to our results, the five-fold dilution factor tested led to better absolute recoveries, with matrix effect of around 75%. As in the case of rice, a two-fold dilution was selected as a compromise. This approach allowed reaching the required sensitivity with matrix effects around 50% that could be corrected with ILIS.

Soybean Samples

Finally, the soybean matrix was tested using the previous treatment developed for maize. Due to the high content of proteins and fats present in this type of matrix, after partitioning and SPE steps, acetonitrile was added to the extract in order to precipitate proteins [29,30]. The extract was centrifuged and the supernatant injected into the system directly and after dilution with water. The effect of dilution (2, 5, 10 and 20-fold) was tested in order to minimize the strong matrix effect still observed. Matrix effects were up to 10% without dilution and after 2-fold dilution, and only after 10- or 20-fold dilution became insignificant, which illustrates the complexity of this matrix when analyzing glyphosate residues. A five-fold dilution was finally selected as a compromise, as it allowed reaching the required sensitivity with matrix effects of around 50%.

In summary, we selected for maize and soybeans a compromise situation between sample dilution and matrix effects observed. Dilution factors higher than applied in this work (i.e. >2-fold for maize, >5-fold for soybeans) would make matrix effects irrelevant but the excessive

dilution would drastically decrease sensitivity, making it troublesome to reach the required residue levels. With the compromise dilution selected and with the use of ILIS for matrix effects correction, accuracy of the method was ensured with reasonable sensitivity and robustness.

Method validation

The method was validated in the three matrices tested, rice, maize and soybeans, following the respective recommended procedures (Figure 1). Validation of the method was made based on European Union SANCO guidelines [31,32]. The determination was focused only on glyphosate (AMPA was not tested), as residue definition only includes the parent compound for maximum residue limits (MRLs) monitoring in the matrices under study [33].

Linearity was evaluated analyzing five standard solutions, in duplicate, in the range of 1-250 µg/L. Standards calibration showed satisfactory linearity in the studied range (1-250 µg/L) with correlation coefficients ≥ 0.99 . The specificity of the method was evaluated by analyzing procedure blanks, processed “blank” samples, and processed “blank” samples spiked at the lowest concentration level tested. No relevant signals (above 30%) were observed at any of the transitions selected in the blank samples.

Precision (repeatability, in terms of % RSD) and accuracy (percentage recoveries) were estimated by recovery experiments in the three matrices under study, at two fortification levels (0.1 and 1 mg/kg for rice and maize, and 2 and 20 mg/kg for soybeans), each one analyzed in quintuplicate (MRLs for glyphosate in the food matrices under study are 0.1 mg/kg for rice, 1 mg/kg for maize, and 20 mg/kg for soybeans [33]). Average recoveries were 77-84% for the rice, 85-100% for maize and 89-96 for soybeans. The method was found to also have satisfactory precision, with RSDs below 17% in all cases (Table 2). The limit of quantification (LOQ) was estimated for a signal-to-noise ratio of 10 from the chromatograms of samples spiked at the lowest concentration validated (i.e. 0.1 mg/kg for rice and maize; 2 mg/kg for soybeans), making use of the quantification transition (Q). The limit of detection (LOD) was estimated similarly to the LOQ but for a signal-to-noise ratio of 3. LOQs were found to be 0.02 mg/kg and 0.03 mg/kg for maize and rice, respectively, and 0.4 mg/kg for

soybeans. Estimated LODs were 0.007, 0.008 and 0.12 mg/kg for maize, rice and soybeans, respectively.

Figure 3 shows the LC-MS/MS chromatograms of GLY for rice, maize and soybeans spiked at the lowest validated level. The chromatographic peaks for the four transitions selected and the compliance of Q/q ratios can be seen in all cases. The higher specificity of the second transition (q_1 167.8 \rightarrow 62.9) is illustrated by the absence of other chromatographic peaks when compared to the quantification transition (Q 167.8 \rightarrow 124), which however was the most sensitive. Therefore, it should not be discarded the use of q_1 for quantification in other matrices if their complexity makes this more specific transition more suitable. The problematic associated to the soybean matrix is illustrated by the worse peak shape obtained.

Performance of the Obelisc N column and analysis of samples

As shown in the previous section, the method was satisfactorily validated for the food samples tested, and therefore can be used for monitoring GLY residues for compliance of MRLs. The sample treatment is uncomplicated and easy to apply, although the partition with DCM and a simple SPE step are required to minimize the strong matrix effects observed for maize and soybean. A derivatization step is not required, as the column used in this work allows sufficient chromatographic retention for glyphosate. Therefore, under the conditions tested, the direct determination of glyphosate is feasible.

Table 2. Results obtained in the validation experiments

Matrix	Fortification level	Recovery (%)	RSD (%)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)
Rice	0.1 mg/kg	84	17	0.03	0.008
	1 mg/kg	77	8		
Maize	0.1 mg/kg	85	1	0.02	0.007
	1 mg/kg	100	8		
Soybean	2 mg/kg	96	5	0.4	0.12
	20 mg/kg	89	6		

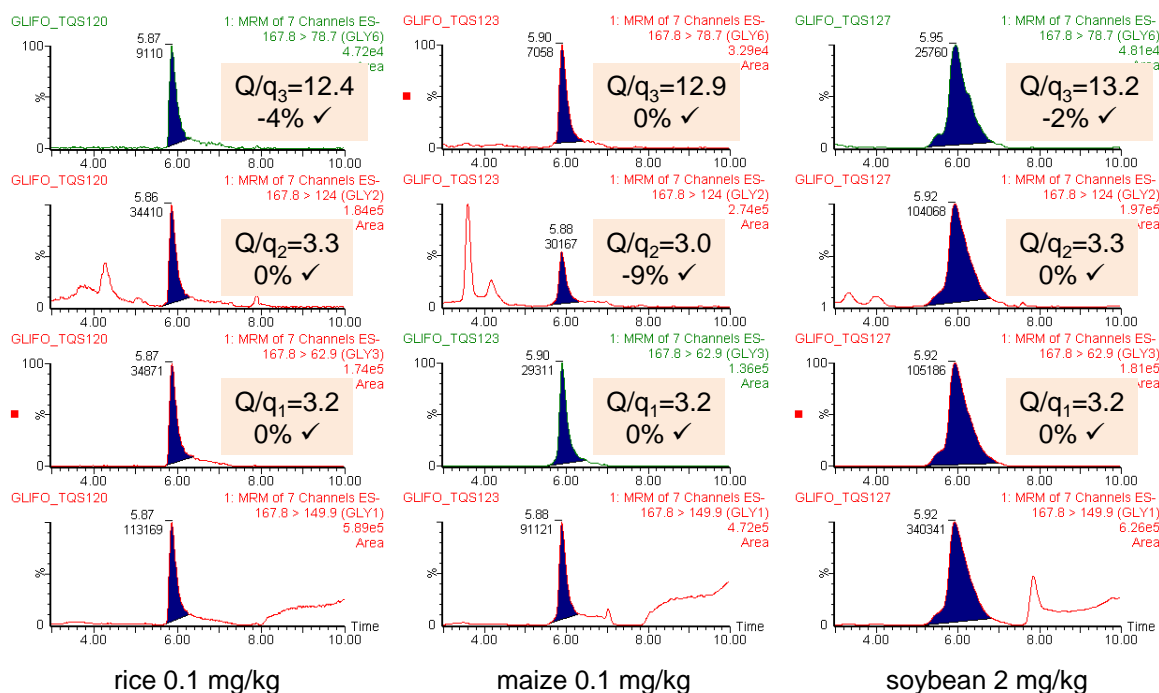


Fig 3. LC-MS/MS chromatograms of glyphosate for rice and maize spiked at 0.1 mg/kg, and soybean spiked at 2 mg/kg.

The main drawback of this method is the poor robustness of the column used. Throughout the method development, validation and analysis of around 20 samples, it was necessary to acquire three columns due to their rapid degradation. With a new column, the retention time of glyphosate was around 7 min, but it rapidly decreased to 3 min after around 100 injections, and peak shape was deteriorated. The higher the complexity of the matrix injected, the higher degradation observed; thus, cleaning-up the sample extracts was important to ensure a longer column-life. Along this work, the column was regenerated every 60 injections approximately using water:ACN 50:50 100mM NH_4Fm at 0.1 mL/min during at least 4 hours.

The validated method was applied to the analysis of 21 samples (7 rice, 2 wheat, 6 maize, 5 soybean, 1 pea) from different areas of South America and Spain. To ensure the quality of the analysis when processing real-world samples, "blank" samples fortified at 0.5 mg/kg (10 mg/kg for soybean) were used as quality controls (QC) and were distributed along the batch of samples every five injections. QCs recoveries obtained were in the range 80-110%.

Glyphosate was detected in one wheat and one pea samples, at concentrations of 0.67 and 0.06 mg/kg, respectively. **(Figure 4)**. Confirmation of the identity of glyphosate was feasible thanks to the accomplishment of retention time and the three Q/q ratios in relation to reference standards in solvent. These findings illustrate the applicability of the method to other vegetable matrices different than tested in this work. The degradation of the Obelisc N column can be observed in the chromatograms of positive wheat and pea, where the R_t decreased even below 3 min.

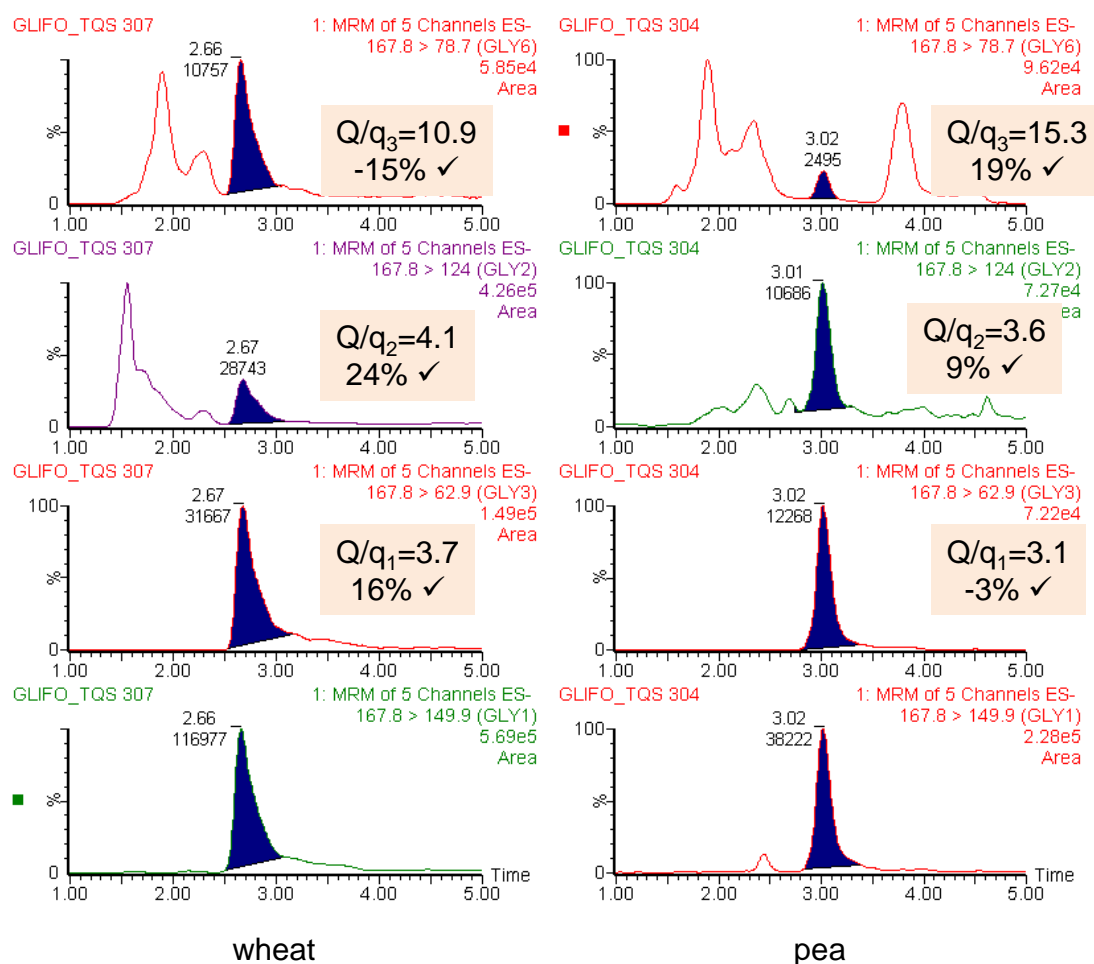


Fig 4. LC-MS/MS chromatograms for glyphosate positive samples

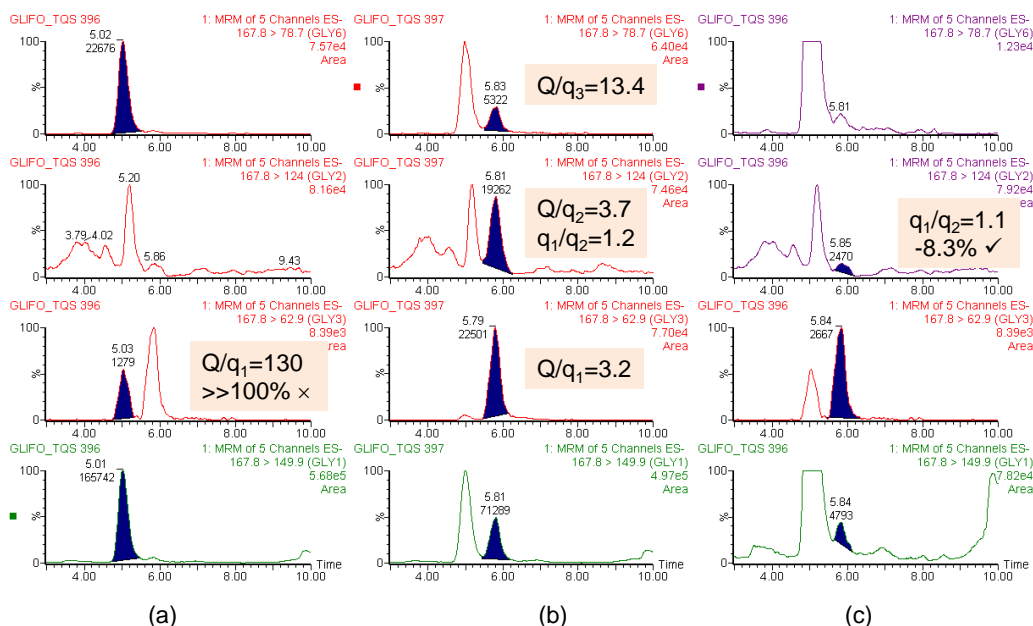


Figure 5. Illustrative LC-MS/MS chromatograms for rice samples. a) Unknown compound in a rice sample, sharing several transitions with glyphosate; (b) rice sample extract spiked with glyphosate; (c) glyphosate peak in the rice sample.

It is worth to mention the problematic observed in several rice samples. Glyphosate identification in this type of matrix was challenging, as shown in **Figure 5**. As it can be seen, a peak was observed for three transitions at 5.01 min (**Figure 5a**), a retention time close to that of glyphosate. However, the experimental Q/q_1 ratio in the sample was 130, far from the theoretical 3.2. It seems that this compound, although surely close in its chemical structure, was not glyphosate. In order to confirm that the compound present in the sample was not glyphosate, the rice extract was spiked with the analyte (5 $\mu\text{g/L}$ in the extract), showing a clear peak at 5.8 min, which obviously was present at the four transitions acquired and fitted the 3 Q/q ratios (**Figure 5b**). This glyphosate peak was in fact present in the rice sample for the transition 167.8 \rightarrow 62.9 although it could not be confirmed due to the impossibility of calculating the Q/q_1 ratio (the transition 167.8 \rightarrow 149.9 is highly interfered) (**Figure 5a**). In order to confirm that the rice sample also contained glyphosate in addition to the unknown interfering compound, we calculated q_1/q_2 ratio (**Figure 5c**), obtaining a deviation lower than the $\pm 20\%$ tolerance. Therefore, the presence of the glyphosate was confirmed in this sample. Therefore, in rice samples the higher specificity of the transition 167.8 \rightarrow 62.9 was more

satisfactory than the more generic 167.8 → 149.9 (due to the loss of water). Consequently, the product ion m/z 62.9 was an efficient alternative for quantification and identification to the most abundant but less specific m/z 149.9.

CONCLUSIONS

In this work, the zwitterionic type mixed-mode phase with normal phase characteristics Obelisc N column has been evaluated for its use in an LC-MS/MS method for the amphoteric herbicide glyphosate. This herbicide has been commonly determined at the residue levels making use of a pre-derivatization step, which allows improving its chromatographic retention in reversed-phase LC. However, the characteristics of Obelisc N have allowed the direct determination of glyphosate without the need of previous derivatization. After selecting the optimum conditions for its chromatographic separation and MS/MS measurement, a method has been developed and validated for glyphosate residue determination in cereals (rice, maize) and in soybean. After extraction with water, severe matrix effects (ionization suppression) were observed in maize and soybean, which were notably minimized by application of DCM partition and a rapid SPE clean-up with Oasis HLB cartridges. The use of isotope-labeled glyphosate as ILIS was satisfactory for correction of the remaining matrix effects leading to an accurate quantification.

The methodology developed in this work allows a rapid and direct determination of glyphosate residues in this type of matrices, although the poor retention times reproducibility, the short life-time of the Obelisc N column and its elevated price are important drawbacks that need to be taken into account. Unless these problems are properly solved, it is necessary to make a large investment in acquiring Obelisc columns as well as daily checking retention times and peak shapes to improve reliability of the analysis. Obelisc N column can be seen as an attractive alternative to the traditional Fmoc-based methods. With appropriate improvements in the column robustness by the manufacturer, this methodology would surely replace most of methods applied up to now.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQD and UPLC-TQS mass spectrometer. The financial support of Generalitat Valenciana (Excellence Research Group Prometeo 2009/054) is acknowledged.

REFERENCES

- [1] H.A. Moye, C.J. Miles, S.J. Scherer, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 69.
- [2] J.E. Cowell, L.J. Kunstman, P.J. Nord, J.R. Steinmetz, G.R. Wilson, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 955.
- [3] L.G.M.T. Tuinstra, P.G.M. Kienhuis, *Chromatographia* (1987) 24696.
- [4] Y.Y. Wigfield, F. Deneault, J. Fillion, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (1994) 543.
- [5] E.A. Hogendoorn, F.M. Ossendrijver, E. Dijkman, R.A. Baumann, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 67.
- [6] J.V. Sancho, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 75.
- [7] J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Int. J. Anal. Chem.* 62 (1996) 53.
- [8] F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 728.
- [9] M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 145.
- [10] M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 51.
- [11] E.A. Lee, L.R. Zimmerman, B.S. Bhullar, E.M. Thurman, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4937.
- [12] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2265.
- [13] J. Bernal, M.T. Martin, M.E. Soto, M.J. Nozal, I. Marotti, G. Dinelli, J.L. Bernal, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4017.

- [14] S. Goscinny, H. Unterluggauer, J. Aldrian, V. Hanot, S. Masselter, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 1177.
- [15] A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 132.
- [16] H.A. Martins-Junior, D.T. Lebre, A.Y. Wang, M.A.F. Pires, O.V. Bustillos, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1029.
- [17] K. Granby, M. Vahl, *Food Addit. Contam.* 18 (2001) 898.
- [18] K. Granby, S. Johannesen, M. Vahl, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 692.
- [19] M. Anastassiades, D.I. Kolberg, D. Mack, I. Sigalova, D. Roux, D. Fugel, EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, Single Residue Methods, Version 6 (August 2011). www.eurl-pesticides.eu, www.crl-pesticides-datapool.eu
- [20] A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, A. Covaci, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5964.
- [21] X. Li, J. Xu, Y. Jiang, L. Chen, Y. Xu, C. Pan, *Acta Chromatogr.* 21 (2009) 559. [22] M.X. Chen, Z.Y. Cao, Y. Jiang, Z.W. Zhu, *J. Chromatogr. A* 1272 (2013) 90.
- [23] Y. Jiang, Z.Y. Cao, R.L. Jai, H. Qi, M.X. Chen, *Chin. J. Chromatogr. A* 30 (2012) 39. [24] N. Yoshioka, M. Asano, A. Kuse, T. Mitsuhashi, Y. Nagasaki, Y. Ueno, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3675.
- [25] L. Goodwin, J.R. Startin, D.M. Goodall, B.J. Keely, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 37.
- [26] M. Lammerhofer, M. Richter, J. Wu, R. Nogueira, W. Bicker, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2971.
- [27] P. Kovarikova, J. Stariat, J. Klimes, K. Hruskova, K. Vavrova, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 416.

[28] HPLC Application of HPLC Separation of Glyphosate Reaction Intermediates and Impurities, Sielc Application note; <http://www.sielc.com/Application-HPLC-Separation-of-Glyphosate-Reaction-Intermediates-and-Impurities.html>

[29] S. Walorczyk, J. Chromatogr. A 1208 (2008) 202.

[30] S. Walorczyk, D. Drozdzyński, J. Chromatogr. A 1251 (2012) 219.

[31] SANCO/12495/2011. European Commission Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Implemented by 01/01/2012.

[32] SANCO/825/00, rev. 8.1. European Commission. Guidance document on pesticide residue analytical methods.

[33] Commission Regulation (EU) No 293/2013 of 20 March 2013 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for emamectin benzoate, etofenprox, etoxazole, flutriafol, glyphosate, phosmet, pyraclostrobin, spinosad and spirotetramat in or on certain products.

3.3.2 Discusión de los resultados

En este artículo científico, el objetivo fue desarrollar un método rápido para la determinación directa de residuos de GLY basado, en principio, en el uso de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography). Se perseguía con ello simplificar la metodología analítica y evitar la etapa de derivatización con FMOC, que lógicamente alarga el tratamiento de muestras e introduce reactivos químicos que no serían necesarios en un método sin derivatización. La cromatografía HILIC es considerada como un enfoque prometedor para el análisis de compuestos altamente hidrofílicos y polares sin necesidad de derivatización.

Las muestras analizadas fueron cereales, incluyendo arroz, trigo, maíz y gluten de maíz, así como guisantes, soja y sus derivados. El estudio se centró exclusivamente en GLY ya que su principal metabolito AMPA no está incluido en la definición de residuo.

Los límites máximos de residuos para GLY permitidos en estos alimentos se muestran en la **Tabla 3.3**

Tabla 3.3 Límites máximos de residuos permitidos en el Codex y en la Unión Europea

Glifosato	Límite Máximo de Residuos (mg/kg)	
	Codex Alimentarius	Unión Europea
Maíz	5	1
Soja	20	20
Guisantes	5	10
Arroz	-	0.1*
Trigo	20	10

Optimización de las condiciones MS y MS/MS

La optimización de la detección por masas se realizó mediante infusión directa de un patrón de GLY a 5 mg/L. Se adquirieron los espectros de masas para seleccionar el ion precursor (modo MS) y los correspondientes iones producto (modo MS/MS), a diferentes energías de cono y de colisión, respectivamente. Las experiencias se realizaron utilizando la interfase de ionización electrospray (ESI) tanto en modo de ionización positivo como en negativo. Se obtuvo mejor sensibilidad en ESI negativo, por lo cual éste fue el modo de ionización finalmente seleccionado. Las transiciones adquiridas fueron las siguientes: 168→150 para cuantificación (Q), y 168→63, 168→124 y 168→79, como transiciones de confirmación (q).

Los iones fragmentos que correspondían a la pérdida de H₂O (168→150) y de dióxido de carbono (168→124) fueron los más abundantes a baja energía de colisión (10 eV). A energías más altas (15-30 eV), los iones derivados del ácido fosfónico (H₂PO₃⁻, PO₃⁻, PO₂⁻) pasaron a ser los más abundantes. En la **Figura 3.19** se muestra el espectro en modo MS y MS/MS y se indican los iones producto observados a diferentes energías de colisión. En la **Tabla 1 artículo científico 5** se muestran las condiciones finalmente seleccionadas para el GLY y el ILIS.

La **Figura 3.20** ilustra las pérdidas observadas y la ruta de fragmentación propuesta para el GLY sin derivatizar. Aunque, por lo general, se intentan evitar transiciones debidas a pérdidas poco específicas, como la pérdida de H₂O, en nuestro caso fue la más abundante, y se usó para cuantificar con el fin de obtener mayor sensibilidad. No obstante, la selectividad en los análisis de muestras reales se aseguró mediante la adquisición de hasta cuatro transiciones y el cumplimiento de las relaciones iónicas Q/q. En el caso de que se observaran problemas de interferencias en la transición de cuantificación en ciertas matrices, se propuso usar como alternativa la transición más específica, aunque menos sensible (168→63) (Q/q=3.2).

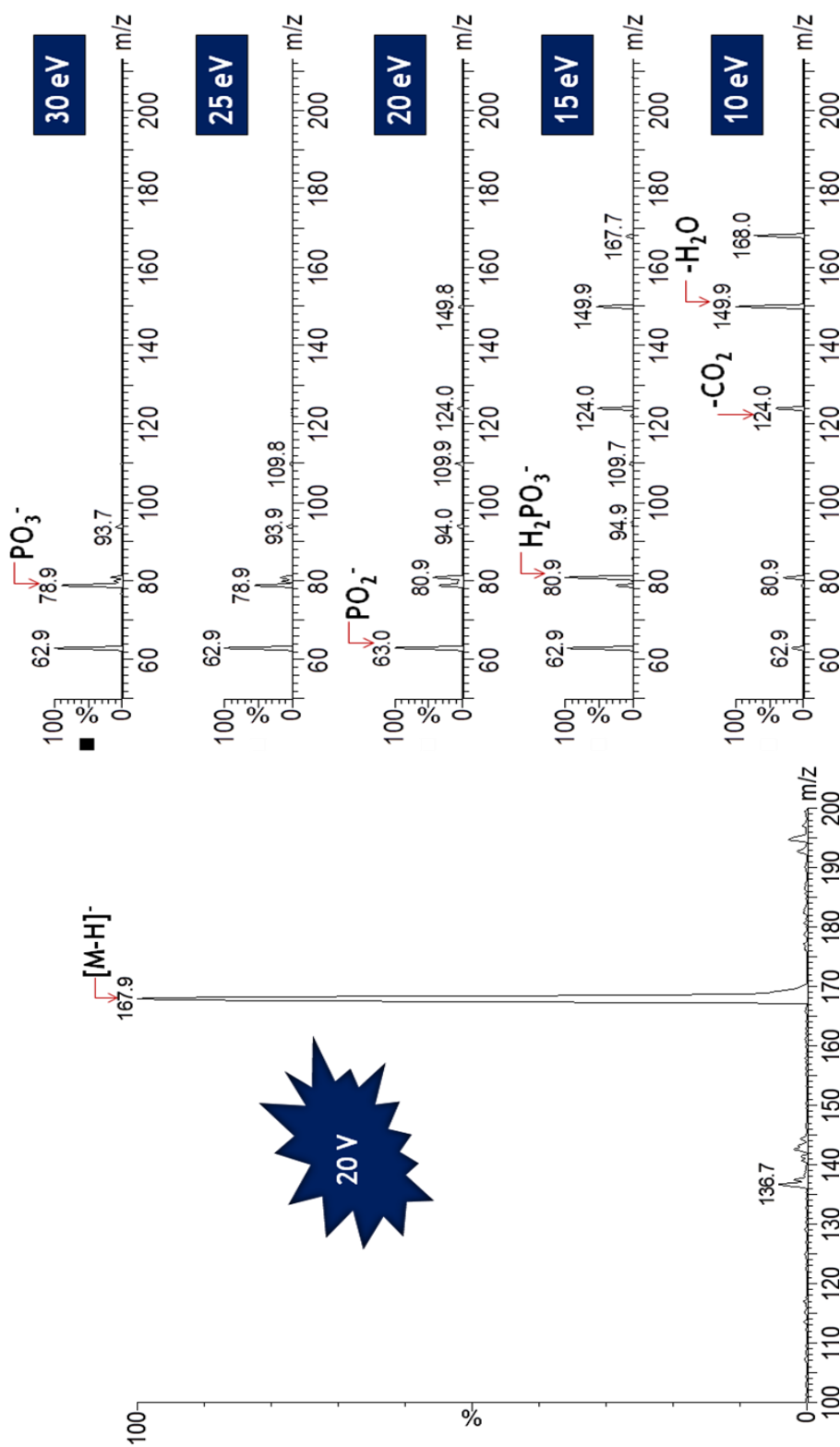


Figura 3.19 Espectros MS (izquierda) y MS/MS (derecha) en modo ESI- para el GLY sin derivatizar.

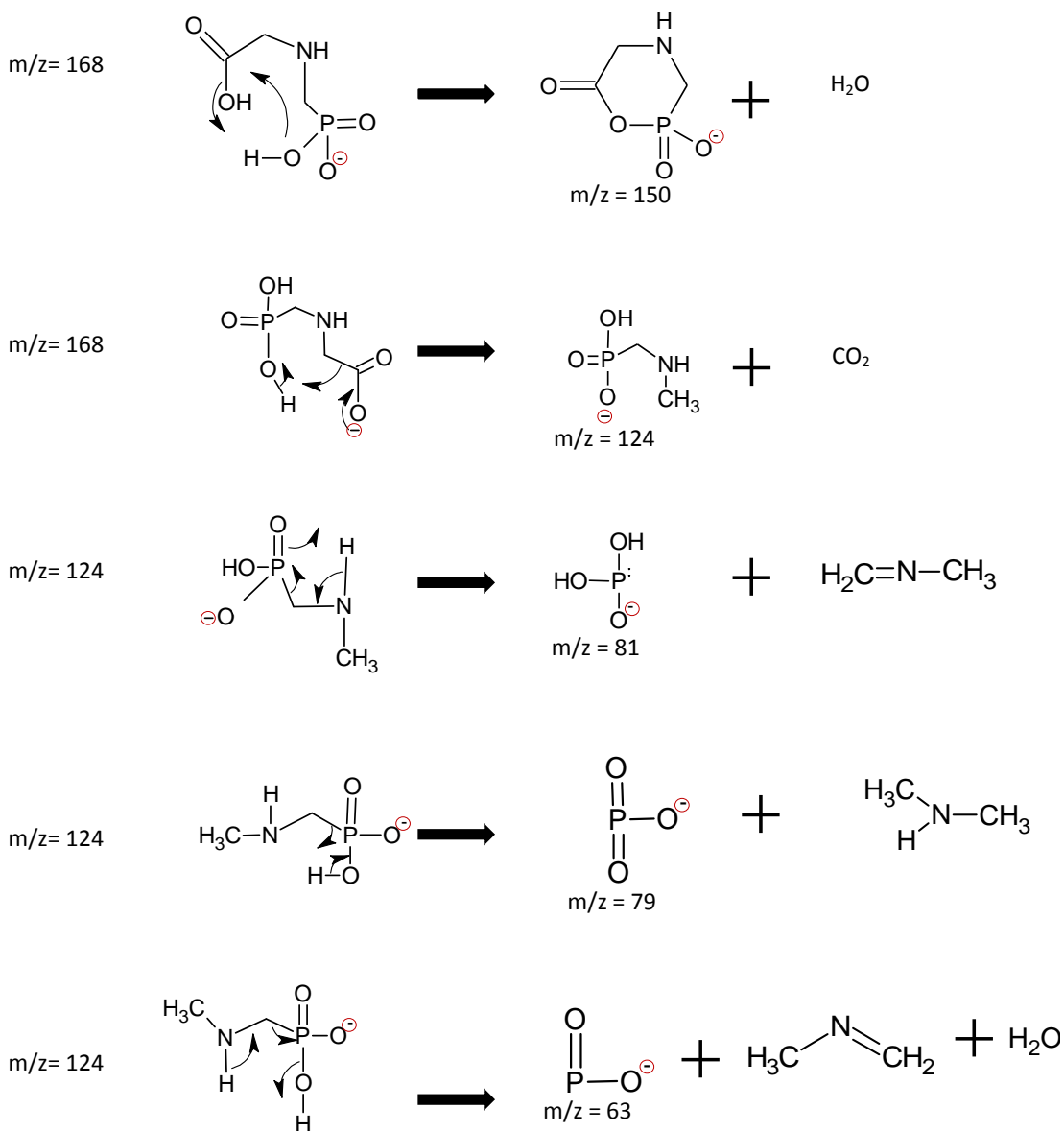


Figura 3.20 Ruta de fragmentación propuesta para GLY en función de los iones observados en los espectros de masas (basado en Goodwin, 2004).

Optimización cromatográfica

Dadas las características especiales del GLY, altamente polar, y con grupos iónicos en su molécula, en la presente **Tesis Doctoral** se intentó su separación cromatográfica mediante cromatografía tipo HILIC, o mediante fases estacionarias tipo *mix-mode*, dado que su retención en modo fase reversa se mostró claramente insuficiente. Para ello, se probaron cuatro columnas cromatográficas (BEH HILIC, BEH amide, Obelisc R y Obelisc N, cuyas características y mecanismos de separación han sido descritos detalladamente en el apartado de Introducción de este capítulo).

Se realizó un estudio detallado de las columnas cromatográficas seleccionadas, probando diferentes fases móviles y modificadores (HCOOH y NH₄Ac). Las primeras experiencias se realizaron con las fases BEH amida y BEH HILIC sin obtener buenos resultados, ya que la retención del analito fue casi inexistente, con mala forma de pico y poca sensibilidad. Al no obtener buenas respuestas con estas columnas, se procedió a utilizar las columnas HILIC **Obelisc R** y **Obelisc N**, ambas de tipo anfotérico (zwitterionico), con fase estacionaria en modo mixto.

Se probó la Obelisc R utilizando como fase móvil H₂O: ACN con 0.1% de HCOOH y distintos porcentajes de H₂O: ACN sin llegar a obtener buenos resultados, ya que ni siquiera se observó el pico cromatográfico.

Solamente con la columna Obelisc N se llegaron a obtener resultados satisfactorios, con buenas formas de pico y sensibilidad aceptable. En primer lugar, se trabajó en las condiciones propuestas por la casa comercial para el GLY, H₂O: ACN (30:70), ambos 20 mM en formiato de amonio (NH₄FM) como modificador, condiciones que corresponderían normalmente a un modo de trabajo tipo HILIC, con bajo contenido en H₂O y más alto en disolvente orgánico. El analito fue inyectando 100% en H₂O. Sin embargo, con esta fase móvil apenas se retuvo el GLY (1.5 min) y las formas de pico no fueron satisfactorias. En consecuencia, se procedió a estudiar diferentes porcentajes H₂O: ACN, a diferentes pH obtenidos con HCOOH, disolución reguladora HCOOH/NH₄FM, y CH₃COOH/NH₄Ac. Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron al aumentar el porcentaje de H₂O (H₂O:ACN 80:20, ambos con 0.1% HCOOH), en modo isocrático, basándonos en las condiciones reportadas para la determinación de GLY en muestras de suero humano con esta misma columna (Yoshioka, 2011). Bajo estas

condiciones, la forma de pico fue buena, con un tiempo de retención aproximado de 5.6 min. Finalmente, también se probaron diferentes condiciones de pH con distintos modificadores en el vial de la muestra, llegando a los mejores resultados con disolución reguladora HCOOH/NH₄FM (pH 3.8). Como volumen de inyección, se seleccionó 50 µL, lo que permitió aumentar la sensibilidad sin afectar negativamente a la forma de pico. En la **figura 2 del artículo científico 5** se muestran los cromatogramas resultantes bajo distintas condiciones de trabajo.

Las razones por las que la columna Obelisc N condujo a los mejores resultados, no son bien conocidas, pues tampoco se conoce exactamente la composición de la fase estacionaria al tratarse de un secreto comercial. Probablemente, sea debido a una combinación de factores como la existencia de una cadena hidrofílica (en contraposición a la cadena hidrofóbica de la Obelisc R) o el hecho de que los grupos cargados positivamente, responsables de un posible intercambio aniónico con el GLY, cargado negativamente, se encuentren en el exterior de la superficie de la fase estacionaria, lo que podría permitir un más fácil acceso de la molécula del GLY.

Tratamiento de muestra: estudio del efecto matriz

Se aplicaron diversos sistemas de extracción para las matrices objeto de estudio y se estudió el ME, después de aplicar diferentes modificaciones en el tratamiento de muestra. El efecto matriz (%ME) fue evaluado igual que en el primer trabajo científico presentado en este capítulo, es decir, a partir de la respuesta del analito en matriz dividida por la respuesta del patrón en solvente de la misma concentración. En todos los experimentos realizados, se apreció supresión en la señal, especialmente para las matrices de soja y maíz. Por tanto, este trabajo fue encaminado a realizar un tratamiento de muestra con la menor manipulación posible, intentando alcanzar un compromiso para que el ME fuera también el menor posible.

Se realizaron varias experiencias previas, usando trituración con Ultraturrax, agitación mecánica y extracción con ultrasonidos, escogiendo finalmente este último por ser más cómodo y rápido (30 min), además de no apreciar ninguna diferencia significativa entre los tres casos, usando H₂O como extractante en todas las matrices estudiadas.

En la matriz de **arroz** el ME no fue importante, pero aun así se decidió hacer una dilución x2 para una mayor protección de la columna, y como compromiso entre sensibilidad y forma de pico, además de menor ME, el cual fue casi inexistente en estas condiciones.

La literatura reporta la importancia de hidratar este tipo de matrices para facilitar la extracción del GLY (Hogendoorn, 1999). En nuestro trabajo, cuando se fortificó la muestra de arroz, se dejó en reposo durante una hora y se extrajo finalmente con H₂O, obteniendo una recuperación del orden del 70%. Por ello, se realizaron experiencias con hidratación previa, dejando después las muestras en reposo a distintos tiempos (1, 12, 24 horas), con recuperaciones del orden del 95%. En la **Tabla 3.4** se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

Finalmente, el procedimiento seleccionado para las muestras de arroz fue el mostrado en la **figura 3.21**.

Tabla 3.4 Efecto de la hidratación previa de la muestra fortificada de arroz sobre la recuperación del GLY (extracción con H₂O y ultrasonidos).

Experiencia	1 h sin hidratar	1 h hidratado	12 h hidratado	24 h hidratado
Recuperación	77%	95%	94%	98%

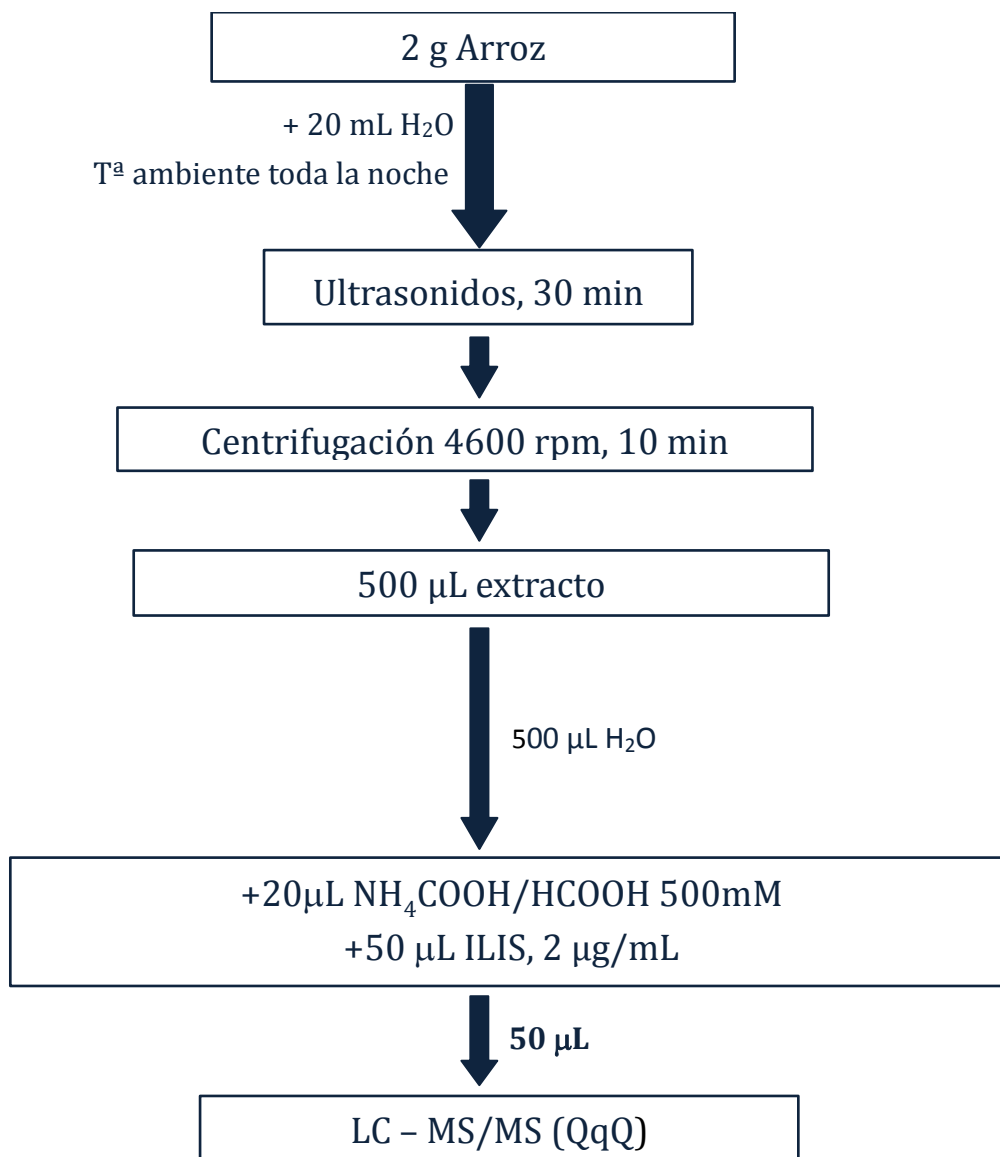


Figura 3.21. Procedimiento aplicado para el tratamiento de las muestras de arroz.

En la muestra de **maíz**, la extracción también se llevó a cabo con H₂O, pero se introdujeron algunas modificaciones debido a la mayor complejidad de esta muestra, para la cual se observó un fuerte (ME 5%, lo que implica una supresión del 95% de la señal). Se aplicó una partición líquido-líquido con diclorometano (DCM), para eliminar la grasa, pero aun así el ME fue todavía del 15%. Por ello, se aplicó también una etapa de *clean-up* con cartuchos OASIS HLB, la cual se mostró también insuficiente, ya que el ME, aunque menos importante, todavía era significativo (ME 30%, supresión de la señal del 70%). Finalmente, se optó por realizar también una dilución x2 del extracto resultante después de pasar por SPE, como compromiso entre sensibilidad y la vida útil de la columna. Las recuperaciones obtenidas fueron del 50%, aproximadamente.

En cuanto a la matriz de **soja**, resultó ser la más complicada de todas. Debido al alto contenido de grasas y proteínas que presentaba esta matriz, después de las etapas de partición con DCM y SPE, se procedió a la eliminación de las proteínas, mediante precipitación con ACN. Dicha precipitación se realizó de modo muy sencillo, tomando una alícuota de 1 ml de extracto de muestra (después de pasar por SPE) y añadiendo 1 mL de ACN, procediendo a su congelación durante 2h a -18°C. A pesar de todos los tratamientos descritos anteriormente, para esta matriz se hizo también necesaria la dilución del extracto finalmente obtenido. Se seleccionó dilución x 5, lo cual permitió alcanzar la sensibilidad necesaria con un efecto matriz todavía notable (ME 50%).

En estas circunstancias, el uso del ILIS fue necesario para corregir el ME, tanto en el caso del maíz como de la soja.

En la **figura 3.22** se indica el procedimiento seleccionado para el tratamiento de las muestras de soja y maíz.

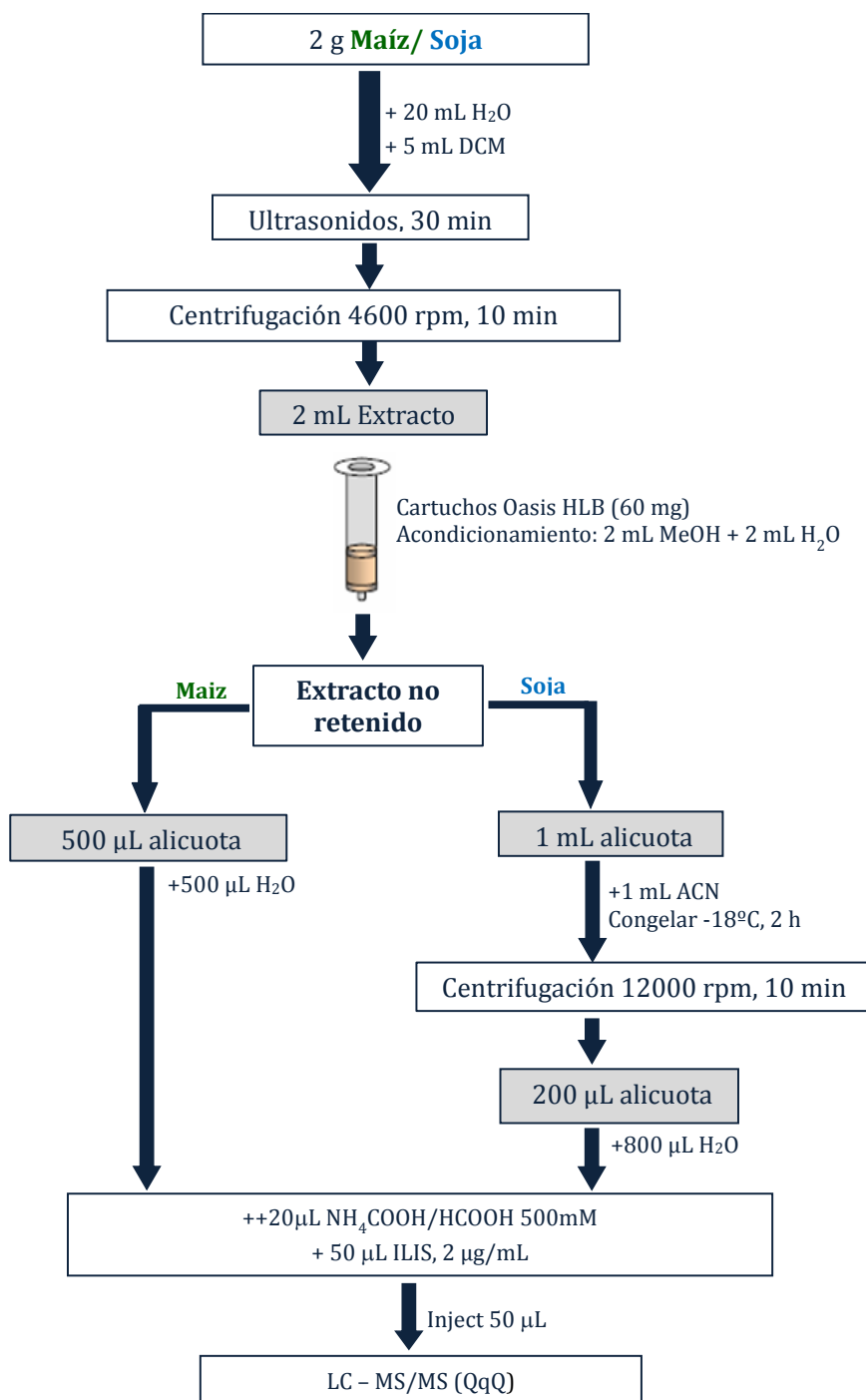


Figura 3.22 Procedimiento aplicado para el tratamiento de muestras de soja y maíz

Validación del método

La validación del método se llevó a cabo en las tres matrices siguiendo las guías SANCO/12495/2011, SANCO/825/00, rev. 8.1 de la EU. El análisis, como ya se ha comentado con anterioridad, solo se realizó para el GLY, ya que su metabolito AMPA no está incluido en la definición de residuo, lo cual implica que los MRLs sólo están establecidos para el GLY en las matrices objeto de estudio (European Union Decision, 2005; Regulation (EC) 293/2013).

El método mostró buena linealidad en el rango estudiado de 1 – 250 µg/L, con $r^2 > 0.99$, y residuales menores del 30%. En cuanto a la recuperación y RSD, se realizaron cinco réplicas a dos niveles de fortificación en cada matriz: arroz y maíz (0.1 y 1 mg/kg); soja (2 y 20 mg/kg). Todos los valores de recuperación se encontraron en el rango 70-100%, con RSD por debajo del 17%. El límite de cuantificación (LOQ), se estimó para una $S/N=10$ a partir de los cromatogramas obtenidos a la concentración más baja validada (arroz y maíz 0.1 mg/kg, soja 2 mg/kg), haciendo uso de la transición de cuantificación (Q). El límite de detección (LOD) se obtuvo de modo similar, para $S/N=3$. En la **tabla 2, artículo científico 5**, se presentan los resultados obtenidos.

En la **figura 3, artículo científico 5**, se muestran los cromatogramas obtenidos para las cuatro transiciones seleccionadas y las relaciones Q/q para arroz, maíz y soja validados al nivel más bajo. Se puede observar la mayor especificidad de la segunda transición (q1 167.8→62.9) con ausencia de otros picos cromatográficos que puedan interferir en la confirmación del analito, en comparación con las demás transiciones. Como ya se ha indicado anteriormente, a pesar de que se usó la transición más abundante (Q 167.8→149.9) para la cuantificación por razones de sensibilidad, no debería descartarse el uso de (q1) para la cuantificación en otro tipo de matrices, por ser más específica. La mayor dificultad de la matriz de soja queda reflejada en la peor forma de pico obtenida.

Análisis de muestras

Una vez el método fue satisfactoriamente validado para las matrices estudiadas, se aplicó a otras muestras con el fin de investigar la presencia de este herbicida y comprobar si los niveles de residuos de GLY se encontraban por debajo de los MRLs.

Se analizaron 21 muestras (7 arroz, 2 trigo, 6 maíz, 5 soja, 1 guisante) tomadas de Sur América y España. Para asegurar la calidad del método, se fortificaron muestras blanco a 0.5 mg/kg (arroz y maíz) y 10 mg/kg (soja), las cuales se usaron como QCs intercalándolas en la secuencia de análisis cada cinco inyecciones. Las recuperaciones obtenidas para los QCs fueron muy satisfactorias, encontrándose en un rango de 80–110%.

Se encontró GLY en una muestra de trigo y en la muestra de guisante, a concentraciones de 0.67 y 0.06 mg/kg, respectivamente (**figura 4 artículo científico 5**). Su identidad fue confirmada mediante tiempo de retención ($\pm 2.5\%$ comparado con el patrón de referencia) y las relaciones iónicas, que estuvieron dentro de las tolerancias permitidas (entre ± 20 y $\pm 50\%$, en función de la relación Q/q). La rápida degradación de la columna Obelisc N se puede observar en los cromatogramas positivos de trigo y guisante, donde el tiempo de retención disminuyó incluso por debajo de 3 min.

Es interesante la problemática encontrada en algunas muestras de arroz, en la que la confirmación de la identidad del GLY fue complicada por la presencia de compuestos interferentes. Este aspecto se discute en el **artículo científico 5**, concluyendo que la mayor especificidad de la transición 167.8 \rightarrow 62.9 hizo que ésta resultara más satisfactoria que la utilizada normalmente para la cuantificación 167.8 \rightarrow 149.9 (más genérica, debida a la pérdida de H₂O). De este modo, el ion producto m/z 62.9 fue una eficiente alternativa para la cuantificación e identificación con respecto al ión más abundante, pero menos específico, m/z 149.9.

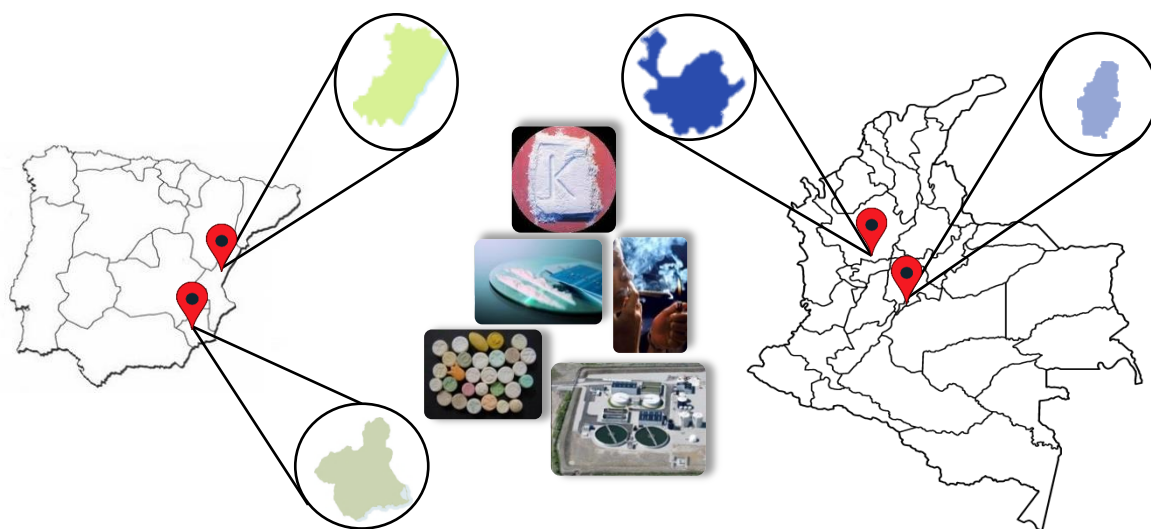
La principal ventaja de este método es que no resulta necesaria una etapa previa de derivatización, pues la columna Obelisc N utilizada en este trabajo permite la suficiente retención cromatográfica del analito, lo que hace factible el análisis directo de GLY. El uso del patrón interno marcado fue clave para la correcta cuantificación, con el fin de corregir el ME aún observado después del tratamiento de muestra, especialmente en soja y maíz. El

principal inconveniente fue, sin embargo, la poca robustez de la columna. Durante las experiencias previas, al desarrollo del método, su validación y el análisis de alrededor de 20 muestras, fue necesaria la adquisición de tres columnas debido a su rápida degradación. Con la columna nueva, el tiempo de retención del analito era de 7 min, pero, a medida que se realizaban pruebas, el tiempo de retención disminuía hasta 3 min y la forma de pico se deterioraba, después de unas 100 inyecciones.

A mayor complejidad de la matriz inyectada, más rápida fue la degradación de la columna. Desafortunadamente, la poca robustez de la columna, el corto tiempo de vida y su alto coste hacen que, de momento, este método sea poco atractivo para análisis de rutina, a pesar de proporcionar resultados analíticos satisfactorios. Esperamos que en un futuro próximo aparezcan nuevas columnas, más robustas y menos costosas, que permitan la separación cromatográfica del GLY sin los inconvenientes anteriormente citados.

Capítulo 4

Investigación de drogas de abuso en aguas residuales urbanas: estimación de su uso en una población



4.1. Introducción: epidemiología de aguas residuales

La epidemiología de aguas residuales (Wastewater-Based Epidemiology, WBE) es una aproximación novedosa que consiste en obtener información de tipo epidemiológico sobre la base del análisis de drogas en las aguas residuales urbanas de una población. Se puede entender como un gran test anónimo de orinas procedentes de miles de individuos, las cuales finalmente se vierten en las aguas residuales.

El promotor de WBE fue Daughton en 2001 (Daughton, 2001), pero fue el grupo de Zuccato quien usó esta aproximación para estimar el consumo de drogas en una población (Zuccato, 2005). Desde entonces, WBE se ha popularizado en la comunidad científica y actualmente es una aproximación ampliamente aceptada a nivel internacional. De hecho, el Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA) ha aceptado e impulsado la WBE como una opción complementaria a los métodos actuales de estimación del consumo de drogas en Europa (EMCDDA, 2014). El análisis de aguas residuales aporta datos más rápidamente y de forma más regular que los actuales planes nacionales de vigilancia. Esta aproximación, usada de forma periódica, se podría convertir en un complemento adecuado a otros métodos de vigilancia sobre el uso de drogas, con el potencial de aportar datos adicionales y una nueva visión sobre las tendencias en el uso de drogas en Europa, incluyendo nuevas sustancias psicoactivas (NPS).

El fundamento de WBE se basa en que las drogas consumidas por la población terminan siendo excretadas a través de la orina principalmente como compuesto inalterado y/o como metabolito. Una vez seleccionado el biomarcador más adecuado (normalmente el compuesto más abundante excretado, que tenga suficiente estabilidad), su determinación en el agua residual permitirá conocer sus niveles de concentración. A partir de estos datos primarios, se puede estimar el consumo de la población si se dispone de la información necesaria (van Nuijs, 2011b, 2011c; Zuccato, 2008). En la **Figura 4.1** se muestran las etapas que componen el proceso de estimación en WBE (Castiglioni, 2014).

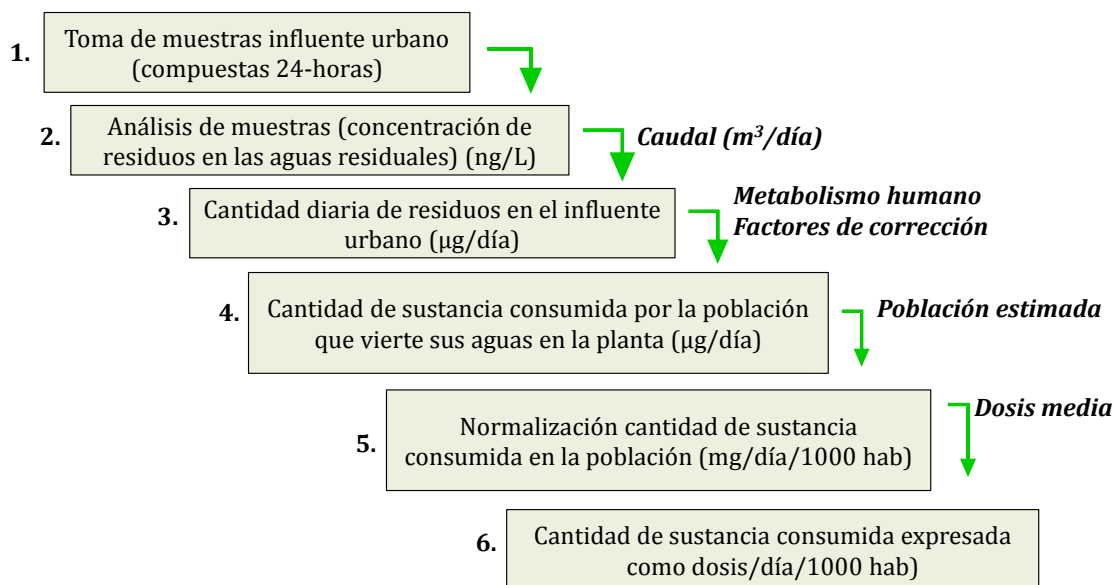


Figura 4.1 Etapas principales en epidemiología de las aguas residuales (wastewater-based epidemiology approach), (Castiglioni, 2014).

A partir de los datos de concentración de la droga (o metabolito más adecuado), se puede obtener información de interés, como: a) cantidad diaria del residuo/biomarcador en el agua residual, si se dispone de datos del caudal diario del influente muestreado ; b) a partir de este dato, es necesario tener información relativa al metabolismo y excreción a través de la orina con el fin de poder calcular el consumo total de droga diaria (normalmente en $\mu\text{g}/\text{día}$); se aplica un factor corrector considerando la excreción media del biomarcador objeto de estudio y la relación de pesos moleculares entre droga inalterada y/metabolito (van Nuijs, 2011c; Zuccato, 2008); c) se normaliza el consumo dividiendo los valores diarios por el número de habitantes de la población objeto de estudio con el fin de facilitar la comparación entre ciudades ($\text{mg}/\text{día}/1000 \text{ habitantes}$); d) finalmente, teniendo en cuenta la dosis media que corresponde a un consumo de droga, se puede estimar el número de dosis/día/1000 habitantes.

Entre 2005 y 2010, sólo unos pocos grupos de investigación aplicaron esta aproximación para estimar el uso de drogas en ciertas poblaciones en estudios realizados a nivel local o nacional aplicando sus propias metodologías pero sin unificar las estrategias y criterios

usados. La falta de criterios comunes hacía muy complicado, si no imposible, comparar los datos obtenidos por diferentes autores en estudios realizados en distintos países. Fue en el año 2010, cuando un grupo de investigadores formó la red SCORE (**S**ewage analysis **C**ORE group **E**urope) con el objetivo de armonizar los trabajos sobre WBE y coordinar los estudios internacionales aplicando protocolos comunes de trabajo. La primera acción organizada por SCORE fue un amplio estudio internacional llevado a cabo en 2011 sobre 19 ciudades europeas. En este estudio se analizaron aguas residuales durante una semana completa y constituyó la primera investigación comparada sobre estimación del consumo de drogas a través del análisis de aguas residuales en Europa (Thomas, 2012). Este trabajo no sólo permitió comparar datos entre ciudades y países, sino también realizar el primer ejercicio de inter-comparación entre los laboratorios participantes para evaluar la calidad de los datos analíticos. También permitió realizar una evaluación de las principales incertidumbres asociadas a esta aproximación (Castiglioni, 2013).

Según los datos obtenidos en ciudades españolas como Castellón, Valencia, Barcelona o Santiago de Compostela, el consumo de cannabis y cocaína es superior al de otras drogas como metanfetamina o éxtasis, encontrándose a un nivel-medio alto comparado con otras ciudades europeas, aunque inferior al de ciudades holandesas (Amsterdam, Utrecht, Eindhoven) o belgas (Amberes) (**Figuras 4.2 y 4.3**).

Por otro lado, el consumo de cocaína en los países nórdicos puede considerarse bajo, mientras que es mayor el de metanfetamina. De hecho, el mayor uso de esta droga se encuentra en ciudades como Oslo (Noruega), Helsinki y Turku (Finlandia), junto a Budweis (República Checa). Por lo que respecta al MDMA (éxtasis), el consumo más alto se observa en las ciudades holandesas (**Figuras 4.4 y 4.5**).

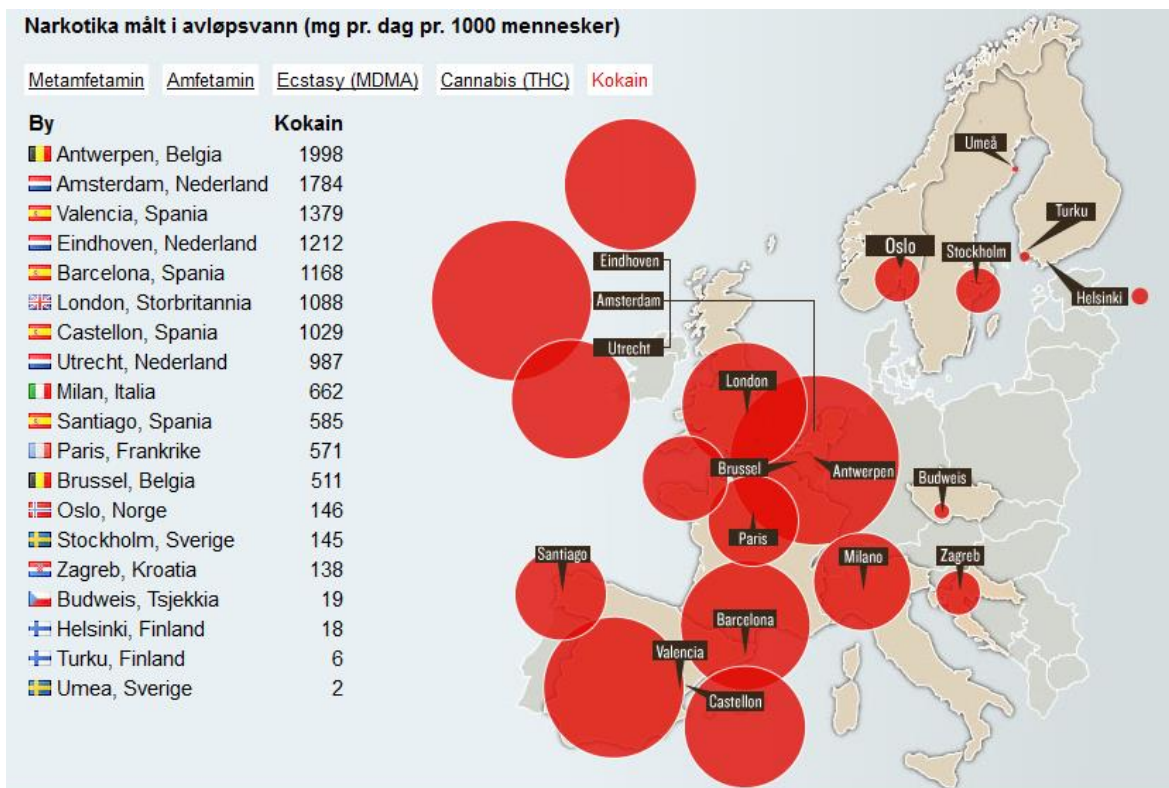


Figura 4.2 Estimación del consumo de cocaína a través de WBE (mg/día/1000 habitantes). Basado en los datos reportados por (Thomas, 2012).

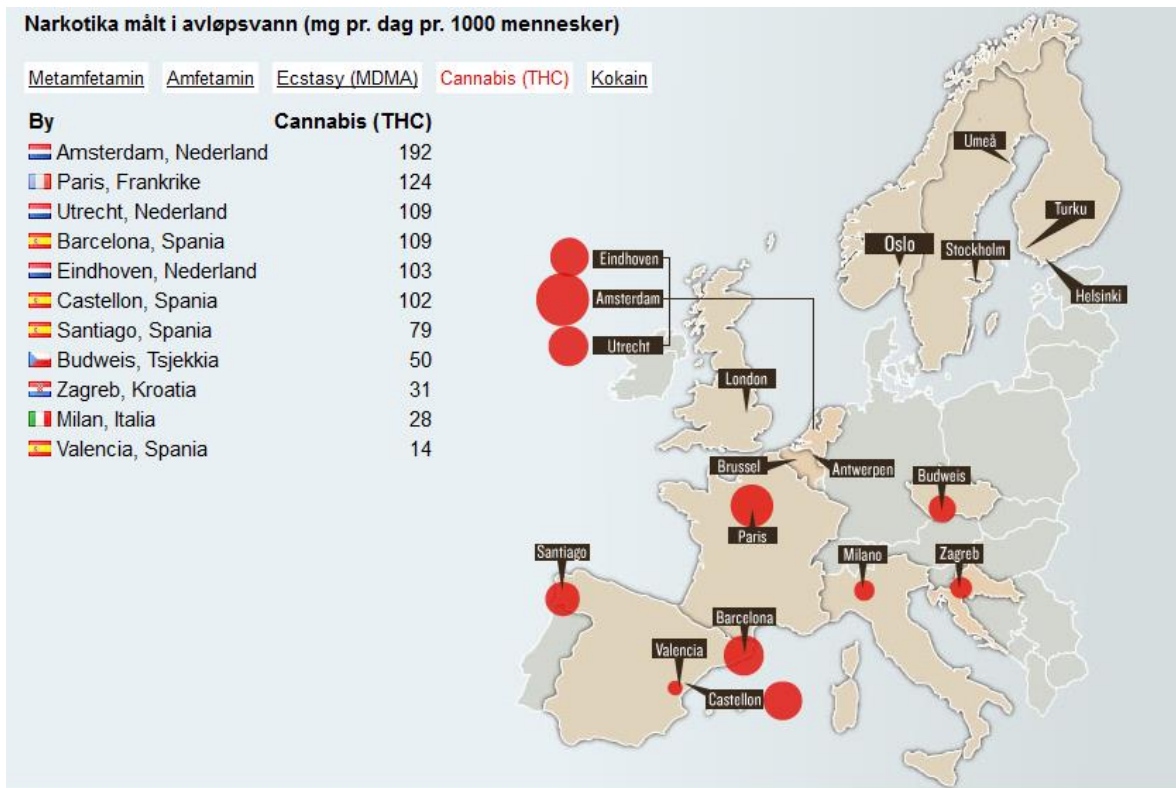


Figura 4.3 Estimación del consumo de cannabis a través de WBE (mg/día/1000 habitantes). Basado en los datos reportados por (Thomas, 2012).

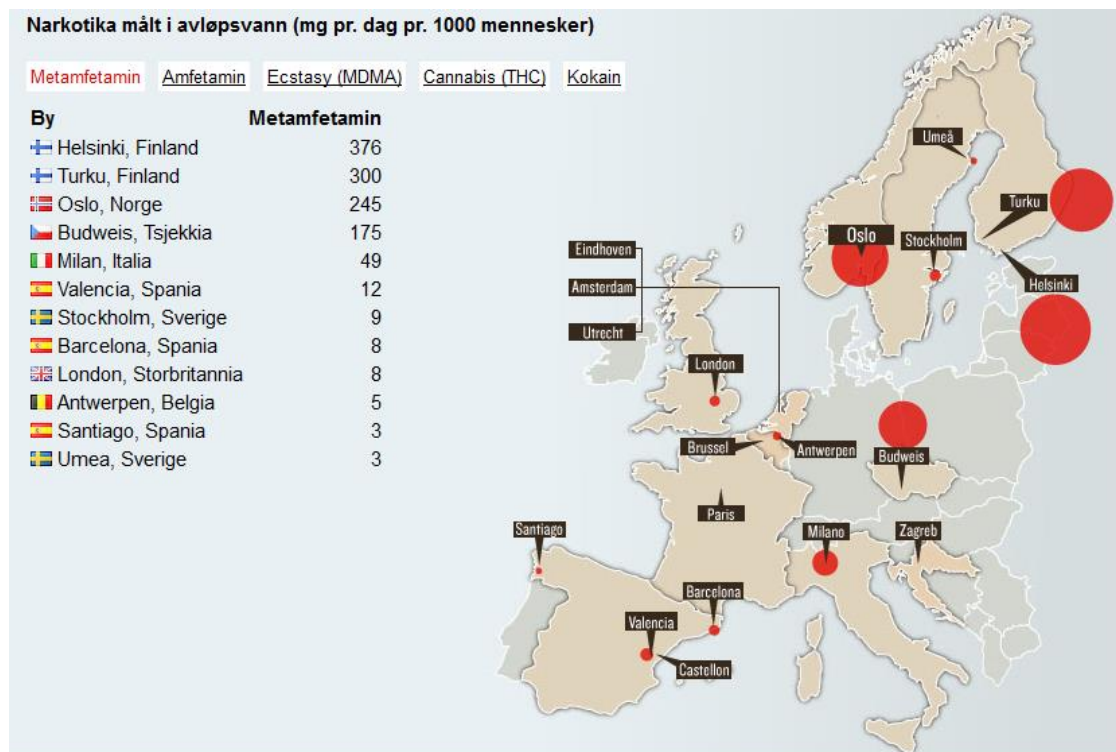


Figura 4.4 Estimación del consumo de metanfetamina a través de WBE (mg/día/1000 habitantes). Basado en los datos reportados por (Thomas, 2012)

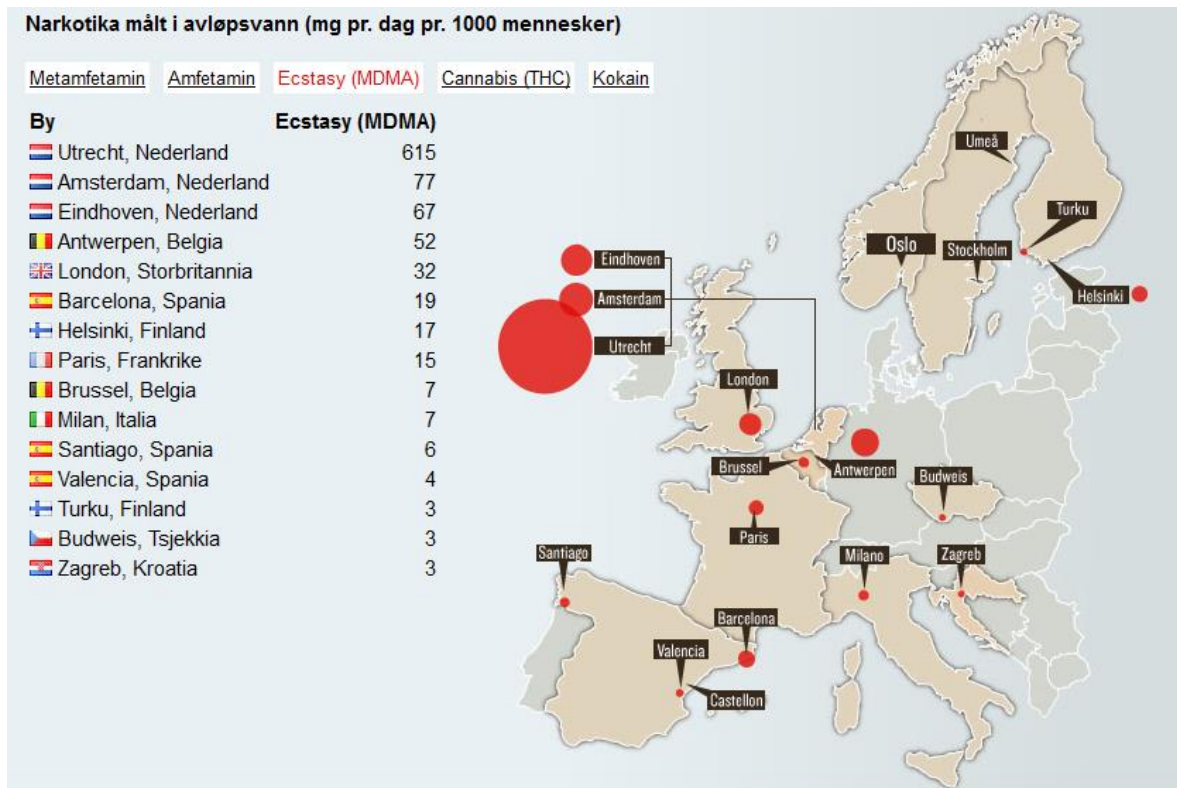


Figura 4.5 Estimación del consumo de éxtasis (MDMA) a través de WBE (mg/día/1000 habitantes). Basado en los datos reportados por (Thomas, 2012).

Después del éxito de este primer trabajo, se realizaron estudios posteriores en 2012 y 2013, ampliando el número de ciudades y de países participantes (Ort, 2014). Se analizaron diariamente aguas residuales a lo largo de una semana en Abril 2012 y en Marzo 2013. En 2012, el estudio incluyó 23 ciudades de 11 países, mientras que en 2013 se amplió hasta 42 ciudades de 21 países (**Figura 4.6**).

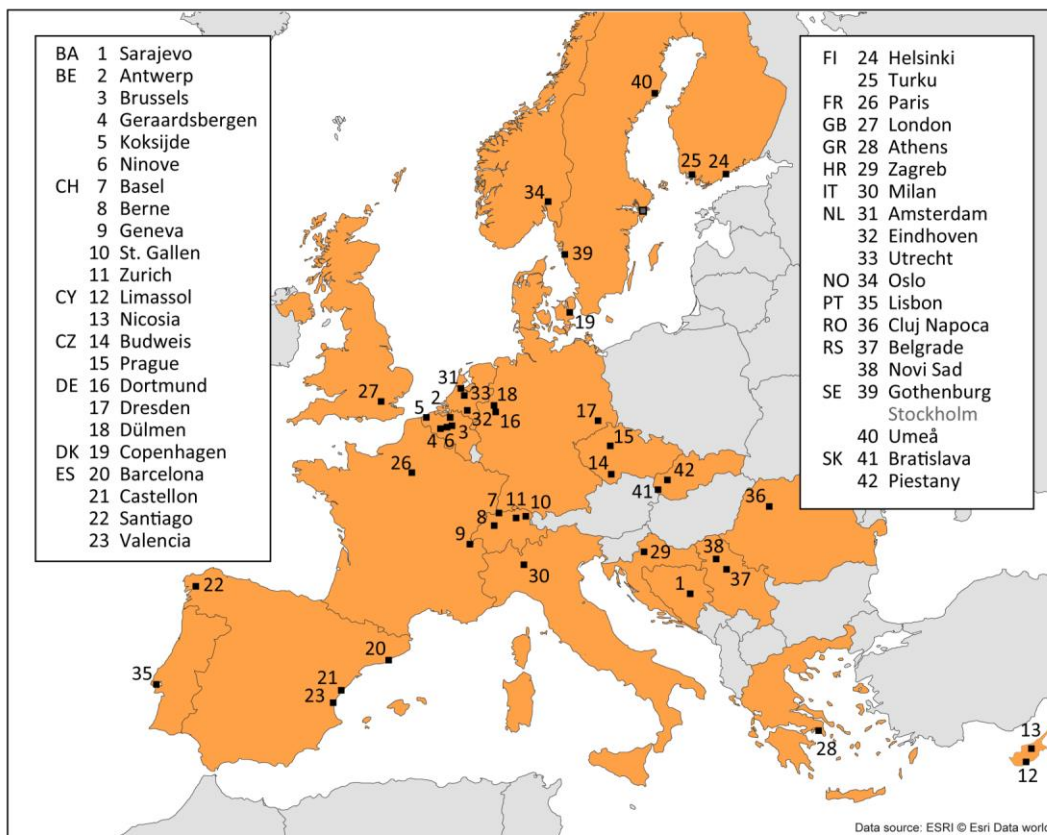


Figura 4.6. Principales ciudades donde se recogieron las aguas residuales procedentes de las plantas de tratamientos (Ort, 2014).

Los datos del estudio realizado en 2011 (19 ciudades, 11 países) (Thomas, 2012) se usaron en este trabajo con fines comparativos. Las aguas residuales analizadas correspondieron a un total aproximado de 8 millones de habitantes, y en ellas se investigó la presencia de cinco drogas: anfetamina, cannabis, cocaína, éxtasis y metanfetamina. Los análisis se llevaron a cabo sobre biomarcadores adecuados de dichas drogas, que fueron: 1) la droga inalterada, en los casos en que se excreta preferentemente sin metabolizar, siendo además el compuesto inalterado suficientemente estable en el agua residual; este fue el caso de la anfetamina, metanfetamina y 3,4-methylene-dioxy-methamphetamine (MDMA o éxtasis), 2) el principal metabolito urinario, producto del metabolismo humano; estos metabolitos fueron BE, en el

caso de la cocaína, y THC-COOH (11-nor-9-carboxy-delta-9- tetrahydrocannabinol), en el caso del cannabis.

Los resultados procedentes del análisis de aguas residuales aportan una valiosa y rápida visión en tiempo real de los flujos y cambios en el uso de drogas, así como posibles variaciones regionales. En el segundo estudio coordinado por SCORE (Ort, 2014) se confirmaron las tendencias observadas en el primero. Así, los niveles de cocaína fueron mayores en el oeste y en ciudades del sur de Europa. Los mayores niveles de anfetamina se encontraron en el norte y noreste de Europa. En cuanto a la metanfetamina, con un uso relativamente bajo y tradicionalmente concentrado en la república Checa y Eslovaquia, empezó a detectarse también en el este de Alemania y en el norte de Europa. Al analizar las tendencias a lo largo de la semana, se observó que cocaína y éxtasis mostraron consumos más altos en fines de semana en la mayoría de ciudades, mientras que el consumo de metanfetamina y cannabis se distribuyó de forma relativamente uniforme a largo de toda la semana.

En mayo de 2015, el EMCDDA elaboró el documento *“Perspectives on drugs: Wastewater analysis and drugs: a European multi-city study”* donde se resumen los datos más relevantes encontrados en este segundo monitoreo, confirmando la utilidad de WBE para la estimación del uso de drogas por la población (EMCDDA, 2015).

El protocolo normalizado de trabajo utilizado en estos estudios incluye varios aspectos, los cuales deben tenerse en cuenta para poder aplicar con éxito esta aproximación, (Castiglioni, 2015).

1) Toma de muestras de la red de aguas residuales.

Es la primera etapa, y una de las más críticas de todo el proceso. La muestra debe ser representativa y debe recogerse a la entrada de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Se toman muestras compuestas de 24 h, idealmente en modo proporcional al flujo debido a las notables fluctuaciones en los caudales de agua que llegan a la planta (Ort, 2010). La toma de muestras debería realizarse cada 5-10 minutos para compensar lo más posible las variaciones continuas de caudal que se producen. Esto supondría un total de 100-200 muestras individuales en un periodo de 24 horas, las cuales se deben mezclar finalmente para originar una única muestra compuesta para los análisis. Debido a que muchas veces no es

posible realizar el muestreo de este modo, suele ser también habitual tomar muestras compuestas de 24-h tomando volúmenes fijos cada 15 o 30 minutos, o como máximo cada hora. No obstante, aunque se tomen volúmenes fijos cada cierto tiempo, se puede hacer una corrección manual de los volúmenes finales mezclados para originar la muestra completa si se tienen datos del caudal, con el fin de que la muestra final sea lo más representativa posible del total diario.

2) Estabilidad de los biomarcadores de drogas en el agua residual.

Es necesario disponer de información sobre la estabilidad de los biomarcadores que se van a analizar en las aguas, tanto en la red de aguas residuales (desde el lugar de excreción hasta el punto donde se realiza el muestreo en la entrada de la EDAR), como durante las 24h de muestreo del agua residual y en el periodo de almacenamiento hasta los análisis. En general, las posibles pérdidas por degradación de las cinco biomarcadores más importantes (anfetamina, metanfetamina y MDMA, BE y THC-COOH) a lo largo de todo el proceso se consideran poco importantes, aunque puede tener lugar cierta transformación de la cocaína presente en las aguas residuales mediante un proceso de hidrólisis hasta su metabolito BE, lo que produciría niveles más altos de este metabolito de los realmente procedentes del metabolismo humano. Este hecho puede conducir a una sobreestimación del consumo de cocaína en ciertos casos. Una vez tomadas las muestras, se recomienda guardarlas inmediatamente en congelador a -20°C, o bien extraerlas en un plazo de 12h en cartuchos SPE. Bajo estas condiciones, se previene la degradación de los biomarcadores de drogas en las aguas residuales.

3) Estimación del número de habitantes

Para poder comparar los resultados entre diferentes lugares, es necesario conocer el tamaño de la población (número de habitantes) que vierte sus aguas residuales a la red. Para ello, se pueden aplicar diferentes métodos, siendo recomendable no aplicar únicamente uno de ellos. Para estimar el número de habitantes, se pueden usar parámetros como la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Nitrógeno o Fósforo total. Pero la fiabilidad de la información depende de factores que muchas veces no pueden ser controlados, como la mezcla de aguas urbanas e industriales. Otra opción evidente es usar datos del censo de población. Lo cierto es que variabilidad entre los diferentes sistemas

usados para estimar la población puede ser muy alta, lo cual introduce notables incertidumbres en el proceso de estimación del uso de drogas (Castiglioni, 2013). La opción recomendada es estimar el número de habitantes mediante las distintas aproximaciones existentes, y a partir de los datos obtenidos escoger el que se considere más fiable teniendo en cuenta la opinión de los técnicos de la EDAR (Ort, 2014; Thomas, 2012). Se han propuesto también otras aproximaciones basadas en la medida en el agua residual de compuestos procedentes del metabolismo humano de fármacos, u otro tipo de productos. Entre los candidatos propuestos se encuentran la cafeína, creatinina, colesterol, diversos fármacos (Daughton, 2012), e incluso la cotinina (principal metabolito de la nicotina) (Castiglioni, 2014; Chen, 2014).

4) Análisis químico y control de calidad

El punto de partida de WBE es la concentración de biomarcador en el agua residual. A partir de este dato, se realizan una serie de cálculos que permiten la estimación del uso de drogas en una población mediante un proceso por etapas que se ha mencionado anteriormente. La cuantificación fiable del biomarcador (metabolito o compuesto original inalterado) es la base de toda estimación posterior.

La principal dificultad de estos análisis estriba en las bajas concentraciones de estos compuestos en las aguas residuales (del orden de 1000 veces inferior al de fluidos biológicos), junto con la complejidad de la matriz, en la que también están presentes otros muchos compuestos que pueden interferir en la identificación y cuantificación del analito. Gracias a los espectaculares avances de la química analítica, actualmente es posible llevar a cabo estas determinaciones, aunque la dificultad sigue siendo evidente. Debido a la polaridad media-alta y baja volatilidad de la mayoría de drogas y metabolitos, la técnica de elección es, sin duda, LC-MS con diversos tipos de analizadores. Los equipos de triple cuadrupolo en métodos analíticos basados en LC-MS/MS son los más utilizados para este fin (Bijlsma, 2009, 2014; Castiglioni, 2006, 2008, 2013; Postigo, 2008; Zuccato, 2008).

El tratamiento de muestra más habitual es SPE, utilizando cartuchos tipo polimérico (ej. Oasis HLB), lo cual permite retener la gran mayoría de compuestos de interés presentes en las aguas residuales en un amplio rango de polaridad. La mayoría de autores utilizan ILIS para corregir posibles errores asociados al tratamiento de la muestra y a su conservación, así

como el efecto matriz observado, que puede llegar a ser muy importante en este tipo de muestras (Castiglioni, 2013).

Normalmente, se adquieren dos transiciones por compuesto, siendo la más sensible la utilizada para cuantificación (Q) y la otra para fines de confirmación de la identidad del compuesto (q). En un estudio realizado recientemente en Europa en el que participaron varios laboratorios, se comprobó que la mayoría de participantes usaban normalmente la misma Q, pero, sin embargo, había diferencias importantes entre las q seleccionadas. En las **Tablas 4.1 y 4.2**, tomadas de la Información Suplementaria de (Castiglioni, 2013), se pueden observar las transiciones usadas por los participantes en dicho estudio. La transición Q usada para cocaína y su metabolito BE fue en todos los casos $304 > 182$ y $290 > 168$, respectivamente. Ambas corresponden a la pérdida de ácido benzoico, que es específica para cocaína y derivados (Bijlsma, 2011; Wang, 1998). Sin embargo, se observan diferencias en el THC-COOH, tanto en modo positivo como negativo (**Tabla 4.1**). En el caso de anfetaminas y derivados, las transiciones Q seleccionadas fueron en general $136 > 91$ para anfetamina, $150 > 91$ para metanfetamina y $194 > 163$ para MDMA (**Tabla 4.2**). En este trabajo, se reportaron dificultades en la determinación del metabolito del cannabis, para el que las condiciones de medida entre distintos autores no son homogéneas, y además la sensibilidad es notablemente menor que para otras drogas, con límites de detección y de cuantificación más altos (Bijlsma, 2014).

Cabe destacar que las relaciones Q/q teóricas (para patrones en solvente) fueron muy dispares entre laboratorios para las mismas transiciones, lo cual puede explicarse porque dependen del equipo utilizado y de las condiciones optimizadas para la medida (ej. voltaje de cono, energía de colisión). Además, pueden verse afectadas también por la matriz de la muestra. Por ello, se aconseja evaluar las relaciones Q/q en cada secuencia de análisis utilizando los patrones incluidos en dicha secuencia. La mayoría de positivos encontrados en las aguas, se pudieron confirmar por el cumplimiento de Q/q dentro de las desviaciones máximas permitidas (entre 20 y 50% dependiendo del valor de Q/q).

Uno de los aspectos más problemáticos en WBE es la estimación de LOD y LOQ realistas, que reflejen correctamente las características analíticas del método aplicado. Esto es debido a la gran complejidad de las aguas residuales así como a las notables variaciones que pueden observarse en su composición. Además, para algunas drogas es complicado encontrar

muestras blanco para preparar un calibrado en matriz, que además debe ser representativo de todas las aguas que se pretenden analizar. De ahí, que la curva de calibrado suele hacerse con patrones en solvente. Si complicado es estimar un LOD/LOQ realista, todavía lo es más realizar una comparación fiable de estos parámetros entre datos reportados por distintos autores debido a los diferentes criterios usados para su estimación. Idealmente, deberían estimarse a partir de muestras blanco fortificadas a un nivel muy bajo de concentración, usando relaciones señal/ruido adecuadas (normalmente $S/N=3$ para LOD y $S/N=10$ para LOQ), pero muchas veces se prefiere el uso del nivel más bajo del calibrado (*Lowest Calibration Level*, LCL) con fines de comparación entre métodos (Castiglioni, 2013).

Finalmente, es importante tener en cuenta que, aunque el método analítico haya sido validado previamente a su aplicación, deben incluirse QC en cada secuencia de análisis, con el fin de comprobar que el método funciona correctamente a lo largo del tiempo y para las muestras objeto de estudio. Lo ideal es preparar los QC con muestras blanco fortificadas a un nivel próximo al LOQ y otro más alto (ej. 10-20x LOQ). Para este fin, lo más adecuado sería usar muestras recogidas entre semana, para que la presencia de drogas sea lo menor posible, intentando así que se aproximen lo más posible a una muestra “blanco”. Las recuperaciones de estos QC indicarán si el método está funcionando correctamente para las muestras y analitos incluidos en los análisis. Normalmente, se suelen aceptar recuperaciones entre 60 y 140% para los valores individuales de estos QC.

Para finalizar, cabe señalar que la medida de biomarcadores adecuados en las aguas residuales permite obtener información no sólo sobre el consumo de drogas, sino también sobre nuestro estilo de vida y hábitos de consumo. La aproximación usada en WBE no solo se ha aplicado a la investigación de drogas de abuso, sino también para establecer perfiles sobre consumo de alcohol (Reid, 2011), tabaco (Castiglioni, 2014) y ciertos fármacos (Venhuis, 2014). Potencialmente, WBE tiene la posibilidad de proporcionar información sobre las dietas, enfermedades, estado general de salud y nivel de exposición a contaminantes ambientales y presentes en alimentos, ya que el agua residual urbana se puede considerar como un medio de diagnóstico de una ciudad (Thomas, 2012). A partir de datos procedentes del análisis de aguas residuales se pueden realizar estudios de tipo epidemiológico y socio-económico orientados hacia la salud pública (Kasprzyk-Hordern, 2014).

Tabla 4.1 Cuantificación y confirmación de cocaína, BE y THC-COOH en aguas residuales mediante análisis realizados por LC-MS (baja y alta resolución) en diversos laboratorios (Castiglioni, 2013)

Compound	Quantification		Confirmatio		
	ILIS ^a	LCL ^b (µg/L)	Transition 1 (Q)	Transition 2 (q)	Q/q ratio
Cocaine	COC-d3 (13)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	BE-d3 (1)	0.01 – 10	304 > 182 (12)	304 > 82 (8)	2.6 – 8.2
				304 > 105 (2)	17.0 – 17.5
				304 > 150 (1)	4.1
		SW ^c 0.1 – 0.25	TOF MS 304.1543	304 > 77 (1)	4.2
			LTQ Orbitrap MS 304.15432	182.1176	-
Benzoyllecgonine (BE)	BE-d3 (11)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	BE-d8 (3)	0.01 – 10	290 > 168 (12)	290 > 105 (7)	2.7 – 7.1
				290 > 77 (4)	1.9 – 5.1
		SW ^c 0.1 – 0.25	TOF MS 290.1387	290 > 82 (1)	8.2
			LTQ Orbitrap MS 290.13848	168.1019	-
				> 168	-
THC-COOH + modo	THC-COOH-d3 (4)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	No ILIS (1)	0.01 – 5	345 > 327 (2)	345 > 299 (2)	2.1 – 4.2
			345 > 193 (2)	345 > 299 (2)	0.3 – 0.5
			LTQ Orbitrap MS 345.2057	> 327	-
THC-COOH - modo	THC-COOH-d3 (3)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	THC-COOH-d9 (1)	5 – 10	343 > 299 (3)	343 > 245 (2)	3.4 – 4.6
	BE-d3 (1)			343 > 191 (1)	6.7
			343 > 245 (1)	343 > 191 (1)	1.5
			TOF MS 343.1915	299.2017	-

Number of laboratories (in brackets)

Four laboratories did not measure THC-COOH, due to analytical issues

^a Isotopic labeled internal standard^b Lowest calibration level, used by the different participants^c Surface water

Tabla 4.2 Cuantificación y confirmación de anfetamina, metanfetamina y MDMA (éxtasis) en aguas residuales mediante análisis realizados por LC-MS (baja y alta resolución) en diversos laboratorios (Castiglioni, 2013).

Compound	Quantification			Confirmation	
	ILIS ^a	LCL ^b (µg/L)	Transition 1 (Q)	Transition 2 (q)	Q/q ratio
Amphetamine	AMP-d5 (6)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	AMP-d6 (5)	0.01 – 25	136 > 91 (10)	136 > 119 (9)	1.1 – 20.3
	AMP-d11 (2)			136 > 65 (1)	4.3
	AMP-d8 (1)	SW ^c 0.5	136 > 119 (2)	136 > 91 (2)	0.3 – 4.6
			TOF MS		
			136.1121	91.0542	-
			LTQ Orbitrap MS		
			136.11199	> 119	-
Methamphetamine	METH-d5 (9)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	METH-d14 (2)	0.01 – 10	150 > 91 (11)	150 > 119 (9)	1.4 – 8.7
	METH-d9 (1)			150 > 65 (2)	5.6 – 11.2
	METH-d8 (1)	SW ^c	150 > 65 (1)	150 > 91 (1)	0.2
	METH-d3 (1)	0.1 - 0.25	TOF MS		
			150.1277	91.0542	-
			LTQ Orbitrap MS		
			150.12773	> 119	-
MDMA	MDMA-d5 (13)	Solvent	MS/MS (QqQ)		
	Methadone-d3 (1)	0.01 – 10	194 > 163 (10)	194 > 105 (5)	1.5 – 3.9
				194 > 135 (4)	1.0 – 8.2
		SW ^c		194 > 77 (1)	2.0
		0.1 - 0.25	194 > 135 (1)	194 > 105 (1)	1.0
			194 > 105 (1)	194 > 133 (1)	0.8
			TOF MS		
			194.1176	163.0754	-
			LTQ Orbitrap MS		
			194.11764	> 163	-

Number of laboratories (in brackets)

^a Isotopic labeled internal standard

^b Lowest calibration level, used by the different participants

^c Surface water

4.2.- Experimental

La metodología usada en este trabajo, en lo relativo a toma de muestras de aguas residuales (únicamente influente urbano) y su posterior análisis se basó en los estudios realizados anteriormente por el grupo SCORE (Castiglioni, 2013; Ort, 2014; Thomas, 2012). El método analítico aplicado, basado en LC-MS/MS, fue el desarrollado por nuestro grupo de investigación (Bijlsma, 2014).

Las muestras analizadas se recogieron en dos ciudades españolas (Castellón, Murcia) y en las dos principales ciudades de Colombia (Bogotá, Medellín). Siguiendo el protocolo de trabajo anteriormente mencionado (Castiglioni, 2013), las muestras obtenidas para el análisis correspondieron a muestras compuestas de 24h tomadas a lo largo de una semana completa. Se recogieron volúmenes fijos cada 15 min en Castellón y Murcia, y cada 30 min en Medellín, comenzando desde las 6:00 am del día 1 de muestreo y terminando a las 6:00 am del día 7. En la depuradora de Bogotá se tomaron volúmenes fijos de 30 ml, con una frecuencia variable en función del caudal. Hasta el momento de su análisis las muestras fueron congeladas a $< -20^{\circ}\text{C}$.

En total, se analizaron 8 compuestos: anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, THC- COOH, 6 M-monoacetylmorfina (MAM, metabolito específico de la heroína) y ketamina. Para cada analito se utilizaron sus respectivos patrones internos marcados, con fines de corrección del efecto matriz y otros posibles errores a lo largo del análisis (pérdidas en el tratamiento de muestra, derivas del equipo, etc). Los ILIS usados fueron los siguientes: anfetamina- d_6 , metanfetamina- d_5 , MDMA- d_5 , cocaína- d_3 , benzoilecgonina- d_3 , THC-COOH- d_3 , 6 MAM- d_6 y ketamina- d_4 .

El equipo utilizado fue un Waters Acquity UPLC acoplado a espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (XEVO TQS, Waters Micromass, Manchester, UK), equipado con un dispositivo T-Wave (Travelling Wave), capaz de aumentar la sensibilidad, selectividad y velocidad de análisis en comparación con los hexapolos utilizados en detectores de masas más antiguos, y, por último, una interfase de ionización ESI trabajando en modo positivo.

La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna Acquity UPLC BEH C_{18} $1.7\ \mu\text{m}$, $50\ \text{mm} \times 2.1\ \text{mm}$ (i.d.) (Waters), trabajando a un flujo de $0.3\ \text{mL/min}$. La columna se mantuvo durante todo el análisis a 40°C y la muestra a 5°C en el sistema de inyección. La fase móvil

estuvo compuesta de agua 5mM NH₄Ac y 0.01% HCOOH (Solvente A): MeOH (Solvente B). El porcentaje de MeOH cambió linealmente de acuerdo con el siguiente gradiente: 0 min 10%; 3 min 90%; 3.5 min, 90%; 3.6 min, 10%; 6 min, 10%, terminado con el equilibrado de la columna.

Tratamiento de muestra

Una vez descongeladas, las muestras de influente provenientes de las respectivas EDAR se filtraron con celulosa de 0.45 µm y se mantuvieron refrigeradas a < 6°C. Antes de realizar la extracción mediante SPE, las muestras se diluyeron para rebajar su carga orgánica tomando 25 mL del influente y añadiéndole agua HPLC hasta 100 mL en matraz aforado (dilución x 4). Antes de aforar en el matraz, a cada muestra se le adicionó 200 µL de la mezcla de ILIS de 10 µg/L.

La extracción mediante SPE se realizó usando un cartucho OASIS HLB 3cc (60 mg) y la elución se llevó a cabo con 5 mL de MeOH. Los extractos se evaporaron bajo corriente de nitrógeno a 35°C y se reconstituyeron en 1 mL de MeOH: agua (10:90, v/v). Finalmente, se inyectaron 3 µL del extracto en el sistema UHPLC-MS/MS (**Figura 4.7**).

En el caso específico de las anfetaminas y derivados (ATS, *Amphetamine-Type Stimulants*) se realizó un *clean-up* adicional con cartuchos OASIS MCX 6cc (150 mg) de intercambio catiónico. Una alícuota de 500 µL procedente del extracto de agua pre-concentrado en HLB (en MeOH:agua 10:90) se diluyó (dil x 10) con agua HPLC acidificada a pH 2 y se pasó a través del cartucho MCX por gravedad. Una vez pasado el extracto a través del cartucho, se lavó con 5 mL de MeOH acidificado (pH 2) y posteriormente se secó a vacío durante unos 10 min. Los analitos se eluyeron con 8 mL de una solución de MeOH al 2% en amoníaco. Los extractos se evaporaron a 35°C utilizando corriente de Nitrógeno y se reconstituyeron en 0.5 mL MeOH:agua (10:90, v/v). Posteriormente, se pasaron a tubos Eppendorf y se añadieron 10 mg de amina primaria-secundaria PSA; se centrifugó y se inyectaron 3 µL del sobrenadante en el sistema UHPLC-MS/MS (**Figura 4.7**).

Las condiciones de medida mediante LC-MS/MS se resumen en la **Tabla 4.3**. Se utilizó ESI en modo positivo, usando la molécula protonada [M+H]⁺ como ion precursor. Se trabajó en modo SRM, adquiriendo tres transiciones por compuesto, con el fin de tener más información

disponible para la identificación de los compuestos detectados: la más sensible (en términos de la relación de señal/ruido) para la cuantificación (Q), y las otras dos para la confirmación (q_1 , q_2). En la tabla también se encuentran los LOD instrumentales y los valores promedios obtenidos para las relaciones Q/q de los patrones de calibración cuando se hizo la validación.

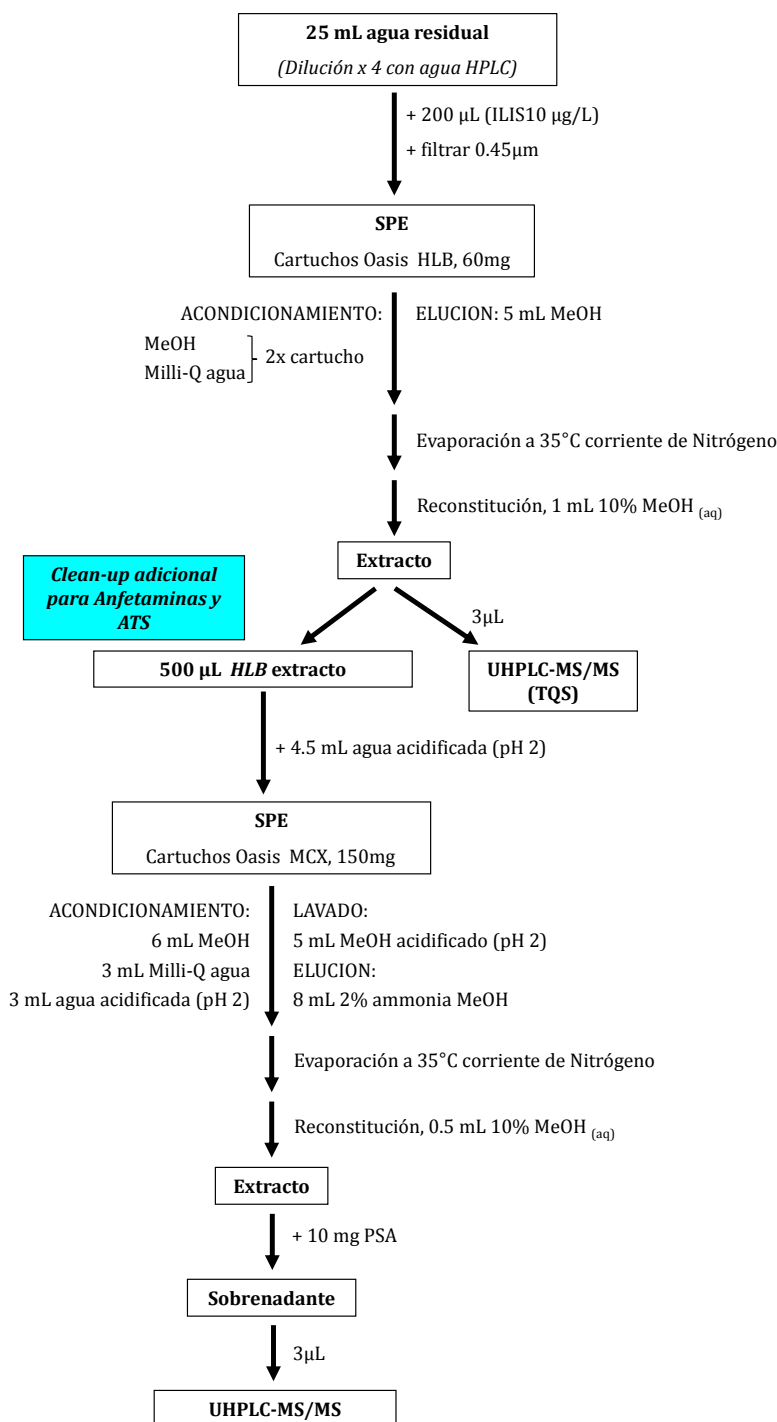


Figura 4.7 Esquema del procedimiento experimental aplicado en el análisis de las aguas residuales, (Bijlsma, 2014).

Compuesto	R _t (min)	LOD (pg)	Q transición	CV (V)	CE (eV)	q ₁ transición	CE (eV)	q ₂ transición	CE (eV)	Q/q ₁ (RSD %)	Q/q ₂ (RSD %)
Anfetamina	1.87	0.95	136 > 91	20	10	136 > 91	20	119 > 91	10	1.2 (10)	1.6 (8)
Anfetamina-d ₆	1.86		142 > 93	20	10						
Metanfetamina	1.87	0.20	150 > 119	35	10	150 > 91	20	150 > 65	35	0.5 (5)	28.8 (16)
Metanfetamina-d ₅	1.86		155 > 121	35	10						
MDMA	1.86	0.13	194 > 163	30	15	194 > 105	25	194 > 77	40	2.0 (3)	7.9 (7)
MDMA-d ₅	1.86		199 > 165	30	15						
Cocaina	2.28	0.13	304 > 182	30	20	304 > 82	30	304 > 77	50	2.9 (8)	10.0 (9)
Cocaina-d ₃	2.27		307 > 185	30	20						
Benzoilecgonina	2.05	0.11	290 > 168	40	20	290 > 82	30	290 > 105	30	5.1 (8)	2.8 (10)
Benzoilecgonina-d ₃	2.05		293 > 171	40	20						
THC-COOH	4.03	0.60	345 > 193	40	25	345 > 299	20	345 > 327	15	0.5 (6)	0.3 (8)
THC-COOH-d ₃	4.02		348 > 196	40	25						
6-MAM	1.69	0.05	328 > 165	40	40	328 > 181	40	328 > 211	25	3.2 (4)	1.4 (7)
6-MAM-d ₆	1.69		334 > 165	40	40						
Ketamina	2.18	0.04	238 > 125	20	25	238 > 207	15	238 > 179	15	5.0 (5)	3.4 (11)
Ketamina-d ₄	2.17		242 > 129	20	25						

Tabla 4.3 Condiciones de medida y parámetros más relevantes para el análisis de drogas de abuso en aguas residuales mediante UHPLC – MS/MS, (Bijlsma, 2014). Abreviaciones: R_t (tiempo retención), LOD (límite de detección instrumental), Q (cuantificación), q (confirmación), CV (voltaje cono), CE (energía colisión).

El método analítico aplicado fue validado por (Bijlsma, 2014), con resultados satisfactorios en cuanto a linealidad, exactitud (en términos de recuperación) y precisión (en términos de RSD).

En general, los resultados obtenidos para la mayoría de los compuestos fueron satisfactorios a los niveles de fortificación ensayados, con recuperaciones entre el 70 – 120% y RDS menores del 20%. En la **Tabla 4.4** se muestran las recuperaciones obtenidas en el estudio de validación de cada uno de los compuestos investigados en este trabajo.

Tabla 4.4 Resultados obtenidos en la validación del método para cada uno de los compuestos determinados en las muestras de influente urbano (n=5), (Bijlsma, 2014).

Compuesto	Recuperaciones (RSD)		LOQ ^a (ng/L)	Q/q ₁ ratio ^b (%)	Q/q ₂ ratio ^b (%)
	100 ng/L	800 ng/L			
Anfetamina	77 (11)	98 (8)	100	0 (-11 to +9)	27 (10 to 37)
Metanfetamina	91 (4)	92 (6)	20	7 (-12 to +5)	74 (-77 to -72)
MDMA	102 (4)	102 (6)	10	7 (-1 to +14)	8 (-22 to +45)
Cocaína	115 (16)	124 (5)	5	8 (-12 to -3)	7 (-14 to -3)
Benzoilecgonina	^c	86 (12)	2	4 (-7 to -2)	11 (-13 to -8)
THC-COOH	105 (5)	115 (8)	60	10 (+5 to +16)	20 (+15 to +24)
6-MAM	86 (12)	83 (8)	40	3 (-7 to +1)	11 (+8 to +16)
Ketamina	99 (2)	103 (8)	10	2 (-6 to +9)	11 (-13 to -9)

^a Valores recalculados de acuerdo con las características de las aguas analizadas y la respuesta instrumental del equipo.

^b Promedio de desviación y rango (en %) de los Q/q ratios experimentales en extractos de muestras fortificadas a 100 ng/L (n=5) en relación con los calculados a partir de patrones en solvente (véase la Tabla 4.3).

^c Valor no calculado debido a la concentración alta encontrada en el “blanco”.

4.3 Discusión de los resultados

Se analizaron un total de 28 muestras de influente urbano procedentes de cuatro ciudades: dos españolas (Murcia y Castellón) y dos colombianas (Bogotá y Medellín). Para cada ciudad se tomaron 7 muestras compuestas de 24 horas (una muestra diaria durante siete días consecutivos).

La planta de tratamiento de aguas residuales de *Castellón* situada en el Camí Fondo de la localidad, es la que depura las aguas recibidas del municipio de **Castellón de la Plana**, con una población estimada de 180.000 habitantes. Actualmente, funciona al 100% de su capacidad, con un caudal diario de 45.000 metros cúbicos por día de aguas residuales, que constituye el volumen máximo de tratamiento que admite la planta. La planta cuenta con diferentes tratamientos entre los que se incluyen secundarios con lodos activados y terciarios coagulación–floculación, filtración, desinfección con ultravioleta, entre otros.

La planta de tratamiento de aguas residuales de *Molina de Segura Norte*, ubicada en la provincia de **Murcia** trata las aguas residuales urbanas conducidas por la red de saneamiento municipal hasta diversas estaciones de bombeo y desde éstas a la estación depuradora de Molina – Norte, ubicada en la zona de Campotejar Baja. Con un caudal diario de 25.000 m³/día de aguas residuales, que constituye el volumen máximo de tratamiento que admite la planta, trata las aguas de una población estimada en unos 70.000 habitantes. Cuenta con diferentes tipos de tratamientos: biológico doble etapa, tratamiento terciario (decantación, filtración y desinfección con rayos UV). La previsión para 2025 de la planta es poder recibir la totalidad de las aguas residuales emitidas por los habitantes de la ciudad de Murcia, que son alrededor de 290.000.

La planta de tratamiento de aguas residuales *El Salitre*, es la instalación que depura las aguas generadas en la zona norte de **Bogotá**, colectadas a través del sistema de alcantarillado e interceptores que confluyen sobre la cuenca El Salitre, donde se encuentra ubicada la EDAR. Está prevista la ampliación de la planta para elevar su capacidad de tratamiento de 4 m³/s a 8m³/s, además de implementar un tratamiento secundario en la instalación, que actualmente solo ofrece tratamiento primario. La planta ayuda a la descontaminación de las aguas residuales de la cuenca del río Salitre, los humedales Torca y la Conejera, con el objetivo de aportar al saneamiento del río Bogotá.

La Planta de tratamiento de aguas residuales de *San Fernando* está localizada en el Municipio de Itagüí en los límites con **Medellín**, siendo vecina de la Central Mayorista de Alimentos. Recibe las aguas residuales de las residencias, la industria y el comercio de Itagüí, Envigado, Sabaneta, La Estrella, parte del corregimiento de San Antonio de Prado y del Municipio de Caldas. Las aguas residuales llegan a la Planta a través de las redes de alcantarillado localizadas en las vías de los barrios, que descargan a los colectores paralelos a las quebradas, los cuales a su vez están conectados a los interceptores localizados en cada costado del río y que, finalmente, van hasta la Planta de San Fernando. La planta efectúa un tratamiento secundario con lodos activados, eliminando entre el 80 y el 85 % de la DBO₅ y el 85% de sólidos suspendidos de las cargas que llegan contaminadas. Finalmente se descarga el agua tratada al río Medellín.

En la **Figura 4.8** se muestran las zonas que vierten sus aguas residuales a las respectivas plantas de tratamiento en Medellín y Bogotá.

En la **Tabla 4.5** se indican características más relevantes, como el promedio de caudal diario y la población estimada que vierte sus aguas en la red, y el modo de muestreo empleado, en cada una de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Como se ha indicado anteriormente, se tomaron muestras compuestas de 24 horas, formadas por sub-muestras recogidas tomando volúmenes fijos cada 15 o 30 min en Castellón, Murcia y Medellín, o bien a tiempos variables en función del caudal en Bogotá. La toma de muestras se llevó a cabo entre los meses de marzo y julio de 2015 de la siguiente manera: Castellón entre los días 25 y 31 de marzo, Murcia del 15 al 21 de abril, Bogotá del 10 al 16 de marzo, y Medellín entre 27 de junio y 3 de julio.

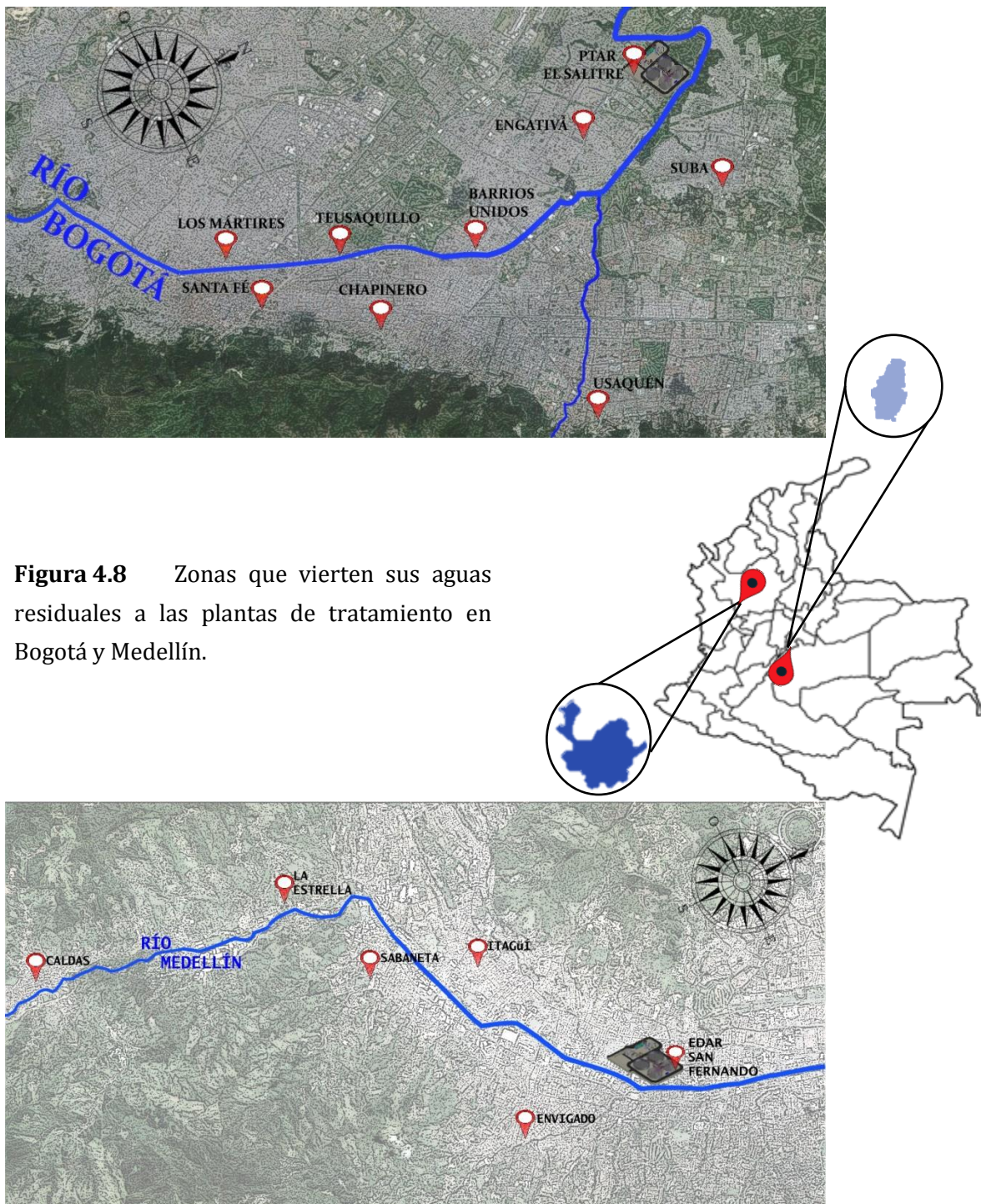


Figura 4.8 Zonas que vierten sus aguas residuales a las plantas de tratamiento en Bogotá y Medellín.

Tabla 4.5 Características de las EDAR investigadas y modo de muestreo (información obtenida de los cuestionarios pasados a las EDAR).

Id	Ciudad	Población Servida	Origen ^a	Caudal promedio del influente (m ³ /d)	Modo muestreo	Localización muestra
1	Castellón	180.690	U	42.372	T15 ^b	Antes de la malla fina
2	Murcia	70.709	U + I	15.656	T15 ^b	Antes de pretratamiento
3	Bogotá	2.500.000	U	359.033	V2.5 ^c	Después de la malla fina
4	Medellín	600.000	U + I	93.475	T30 ^b	Después de la malla fina

^a: urbano (U); industrial (I)

^b: Time-proportional: volumen fijo / tiempo fijo a frecuencia establecida (cada 15 o 30 min)

^c: Volume-proportional: volumen fijo / frecuencia variable en función del caudal

Las concentraciones obtenidas (en ng/L) mediante los análisis realizados por LC-MS/MS en las muestras de influente urbano de las cuatro ciudades se encuentran en la **Tabla 4.6**. Para controlar la calidad de los análisis realizados, se intercalaron QC en cada secuencia de análisis y se analizaron junto con las muestras. Los QC se prepararon a partir de muestras “blanco” fortificadas de influente urbano recogidas entre semana, con el fin de que las concentraciones de las drogas presentes en estas muestras “blanco” fueran lo más bajas posibles. En todos los casos, las recuperaciones de los QCs analizados se encontraron entre 60-140% para todos los analitos incluidos en el estudio.

Ciudad	Compuesto	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Castellón	Cocaína	24	20	76	80	348	140	124
	Benzoilecgonina	392	360	200	432	1256	588	596
	MDMA	16	13	-	<10	14	12	20
	THC-COOH	188	208	160	216	220	210	228
Molina de Segura Norte (Murcia)	Cocaína	348	352	344	584	220	345	440
	Benzoilecgonina	1232	976	992	1048	828	872	1392
	MDMA	22	20	19	14	12	16	30
	THC-COOH	252	216	40	52	188	164	228
Bogotá	Cocaína	544	64	612	668	660	808	640
	Benzoilecgonina	1148	1384	1456	1440	1412	1716	1524
	MDMA	20	12	12	20	32	60	68
	THC-COOH	184	196	268	260	228	216	204
	Ketamina	24	28	28	32	20	24	24
Medellín	Cocaína	1132	152	60	64	296	292	440
	Benzoilecgonina	5348	4748	4912	5268	5500	6056	6160
	MDMA	12	<10	-	-	-	-	14
	THC-COOH	320	320	264	280	268	312	344
	Ketamina	<10	<10	12	<10	<10	12	14

Tabla 4.6 Concentraciones de drogas (expresadas en ng/L) en las aguas residuales de las ciudades objeto de estudio

Se puede observar que en todas las ciudades los niveles más altos, con diferencia, corresponden al principal metabolito de la cocaína, la BE, con muchas de las muestras superando los 1000 ng/L (1 ppb). Las concentraciones de BE fueron más altas en las aguas residuales de Colombia, que también presentaron unos niveles altos de cocaína, considerablemente superiores a los de las dos ciudades españolas. Aparte de la cocaína y su metabolito BE, cabe destacar los niveles relativamente altos del metabolito principal del cannabis, THC-COOH, cuyas concentraciones en las aguas de las ciudades españolas y colombianas fueron bastante similares (concentraciones entre 100 y 300 ng/L en la mayoría de muestras).

Además de estas dos drogas, que parecen ser las más consumidas por la población, se detectó MDMA en la mayoría de muestras, a concentraciones por debajo de 30 ng/L, excepto en las muestras de fin de semana de Bogotá en las que alcanzó los 60 ng/L. La ketamina sólo se detectó en las muestras de Colombia, en concentraciones inferiores a 30 ng/L.

A modo ilustrativo, se incluyen cromatogramas seleccionados de muestras positivas en las que se han detectado, identificado y cuantificado las drogas objeto de estudio. Las **Figuras 4.9-4.16** corresponden a diferentes muestras recogidas en las EDAR de las ciudades objeto de estudio. Se puede observar que en todos los positivos (cocaína, BE, THC-COOH, MDMA, Ketamina) se pudo confirmar la identidad del compuesto mediante las relaciones Q/q, que se encontraron dentro de los márgenes de error aceptados en comparación con las Q/q obtenidas para los patrones en solvente (desviación máxima permitida entre 20 y 50% dependiendo de la relación Q/q) (Decisión 657/CE/2002) (SANCO 10684/2009).

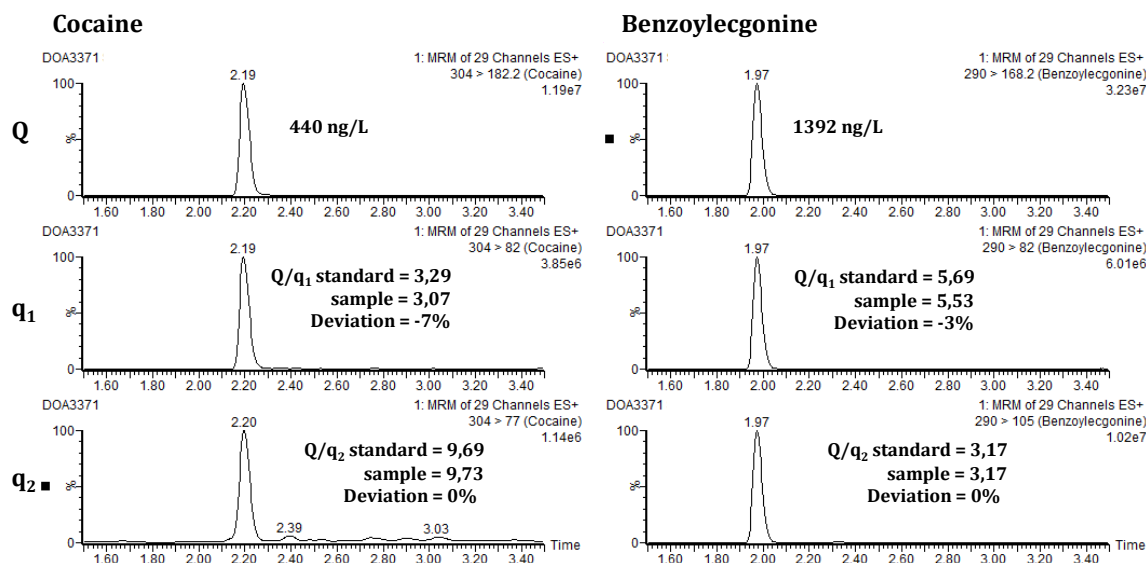


Figura 4.9: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a cocaína y su metabolito BE en una muestra de influente urbano recogida en fin de semana (domingo 19 de abril de 2015) en **Murcia**. (Q) transición de cuantificación; (q₁)(q₂) transiciones de confirmación

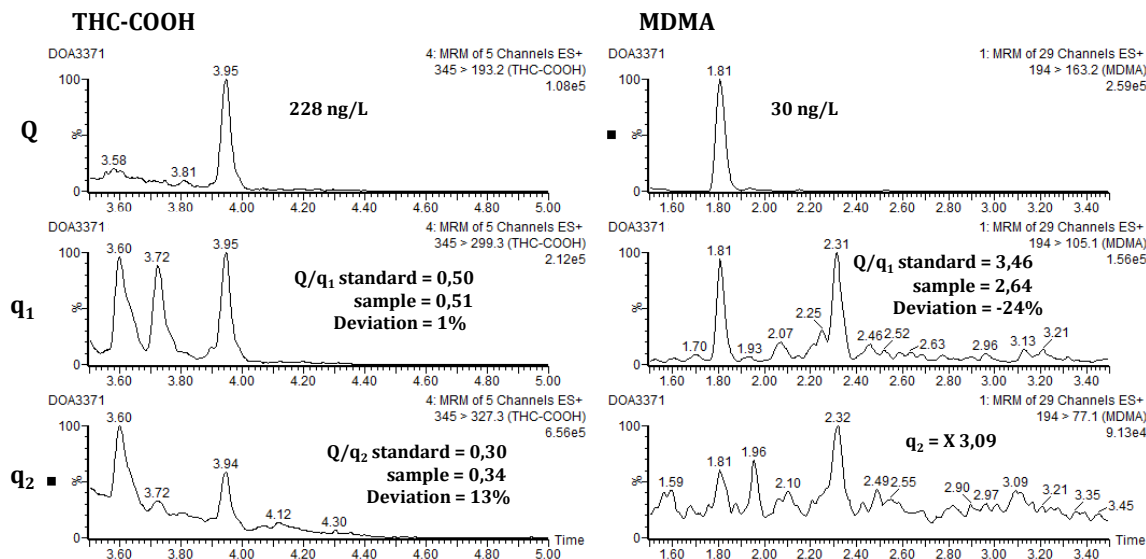


Figura 4.10: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a THC-COOH y MDMA en una muestra de influente urbano recogida en fin de semana (domingo 19 de abril de 2015) en **Murcia**. (Q) transición de cuantificación; (q₁)(q₂) transiciones de confirmación

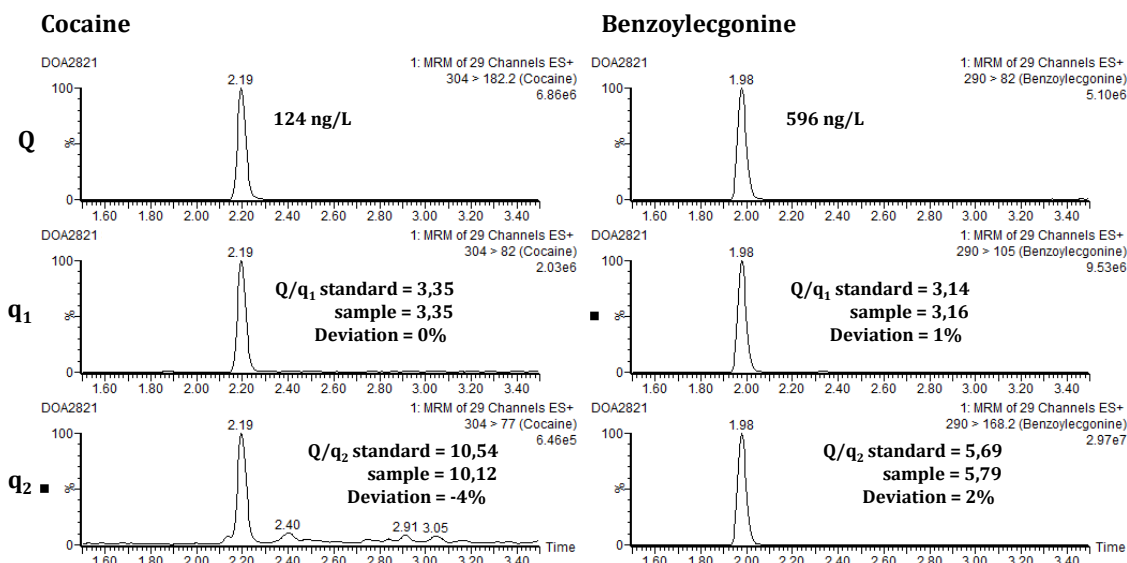


Figura 4.11: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a cocaína y su metabolito BE en una muestra de influente urbano recogida en fin de semana (domingo 29 de marzo de 2015) en Castellón.

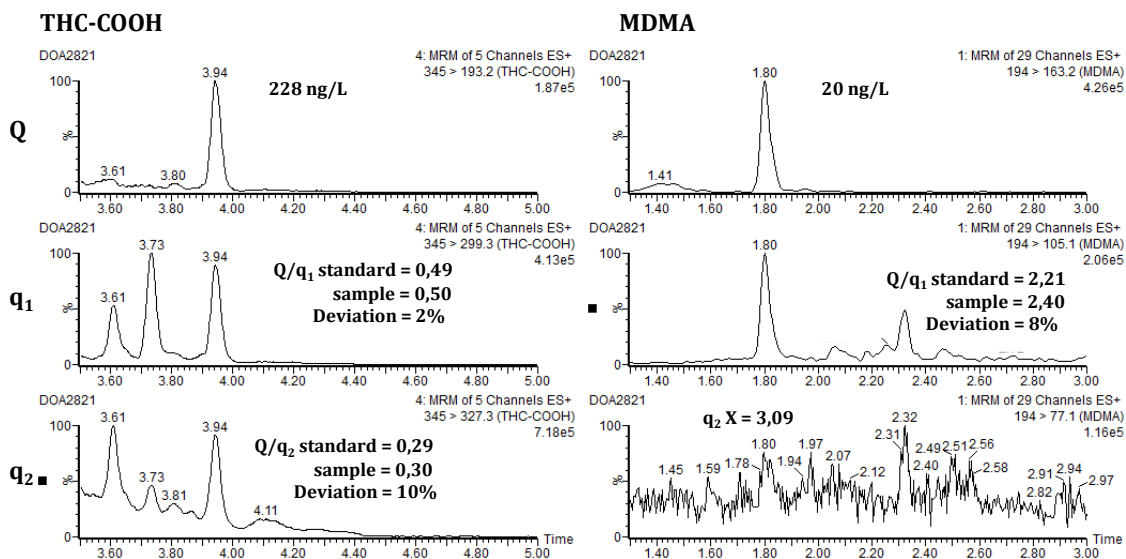


Figura 4.12: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a THC-COOH y MDMA en una muestra de influente urbano recogida en fin de semana (domingo 29 de marzo de 2015) en Castellón.

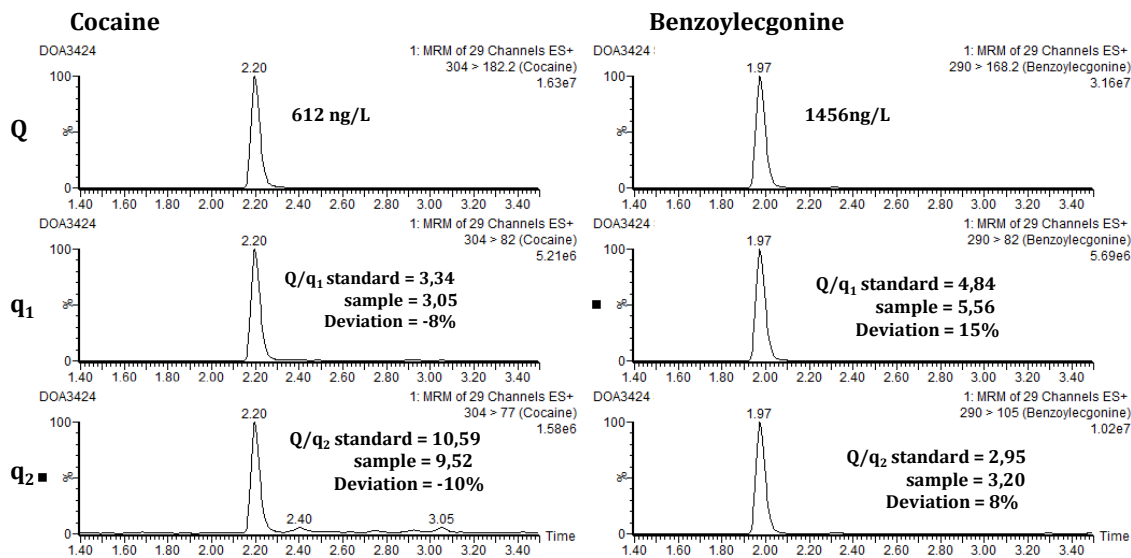


Figura 4.13: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a cocaína y su metabolito BE en una muestra de influente urbano recogida el miércoles 11 de marzo de 2015 en **Bogotá**.

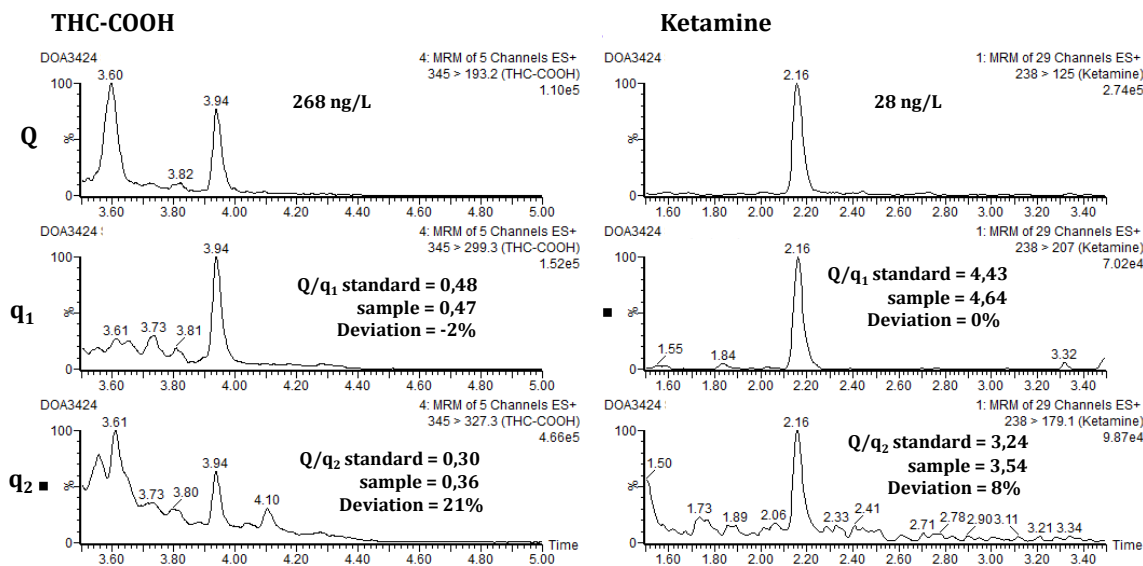
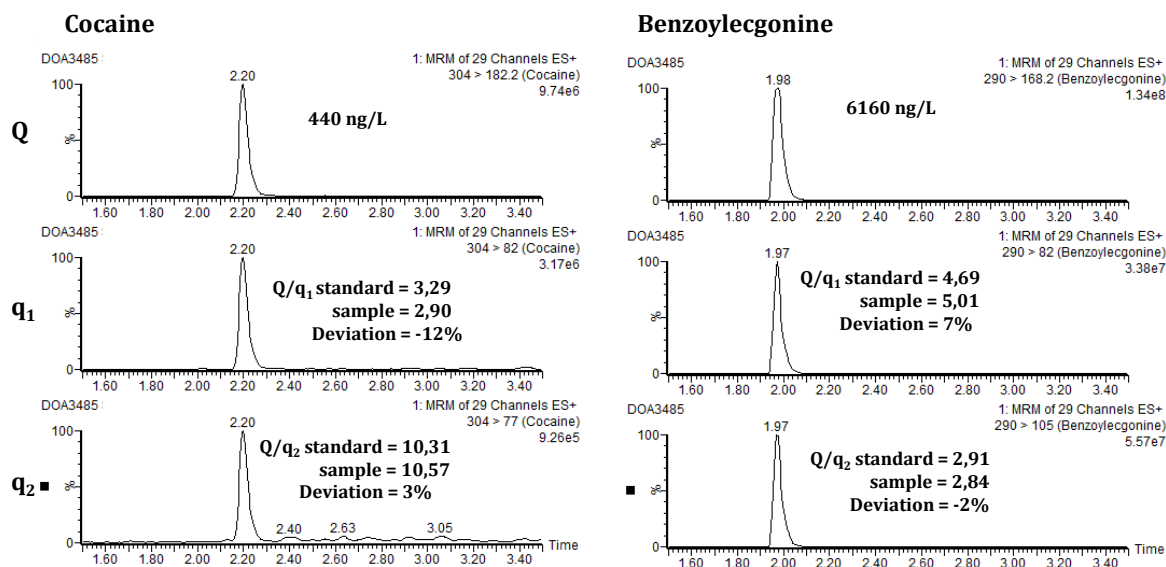


Figura 4.14: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a THC-COOH y Ketamina en la muestra de influente urbano recogida el miércoles 11 de marzo de 2015 en **Bogotá**.



4.15: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a cocaína y su metabolito BE en la muestra de influente urbano recogida el domingo 28 de junio de 2015 en **Medellín**.

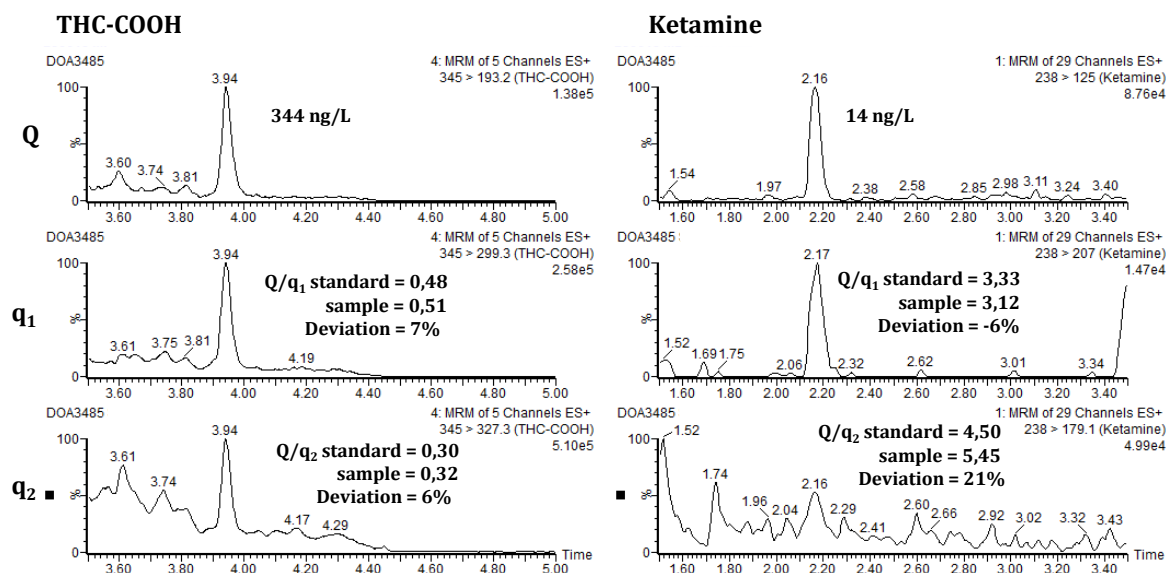


Figura 4.16: Cromatogramas UHPLC-MS/MS correspondientes a THC-COOH y Ketamina en la muestra de influente urbano recogida el domingo 28 de junio de 2015 en **Medellín**.

Es interesante observar la evolución de las concentraciones de drogas en las aguas residuales a lo largo del día de la semana, con el fin de comprobar si el consumo de una cierta droga es estable a lo largo de la semana, o si aumenta durante los fines de semana. Para esta comparación, es mejor usar los datos de la carga diaria de droga (g/día) en las aguas residuales teniendo en cuenta los valores de caudal diario (m³/día) (**Tabla 4.7**). Este dato se obtiene al multiplicar las concentraciones en el agua (ng/L) por el caudal diario (m³/día) de la siguiente manera:

$$\frac{ng}{L} (Tabla\ 4.6) \times \frac{m^3}{día} (Tabla\ 4.5) \times 1000 \frac{L}{m^3} = \frac{ng}{día} \times 10^{-9} \frac{g}{ng} = \frac{g}{día} (Tabla\ 4.7)$$

Ciudad	Compuesto	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Castellón	Cocaína	0.9	0.8	3.8	3.9	15.2	5.4	4.6
	Benzoilecgonina	14.7	14.6	10.1	21.2	54.9	22.5	22.2
	MDMA	0.6	0.5	-	-	0.6	0.5	0.7
	THC-COOH	7.0	8.4	8.0	10.6	9.6	8.0	8.5
Murcia (Molina de segura Norte)	Cocaína	5.5	5.7	5.4	9.3	3.3	5.3	7.0
	Benzoilecgonina	19.5	15.8	15.6	16.6	12.3	13.4	22.1
	MDMA	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.5
	THC-COOH	4.0	3.5	0.6	0.8	2.8	2.5	3.6
Bogotá	Cocaína	196.9	22.6	216.8	244.4	237.0	285.5	233.7
	Benzoilecgonina	415.6	489.3	515.8	526.9	507.0	606.3	556.5
	MDMA	7.2	4.2	4.3	7.3	11.5	21.2	24.8
	THC-COOH	66.6	69.3	94.9	95.1	81.9	76.3	74.5
	Ketamina	8.7	9.9	9.9	11.7	7.2	8.5	8.8
Medellín	Cocaína	97.2	15.1	5.9	6.3	28.8	27.9	34.7
	Benzoilecgonina	459.1	471.8	485.6	517.8	535.6	579.1	486.3
	MDMA	1.0	0.8	-	-	-	-	1.0
	THC-COOH	27.5	31.8	26.1	27.5	26.1	29.8	27.2
	Ketamina	0.7	0.8	1.2	0.8	0.8	1.2	1.0

Tabla 4.7 Carga total diaria de drogas (expresada en g/día) en las aguas residuales de las ciudades objeto de estudio.

En las **Figuras 4.17-4.21** se puede observar la evolución de las cargas diarias de drogas a lo largo de la semana.

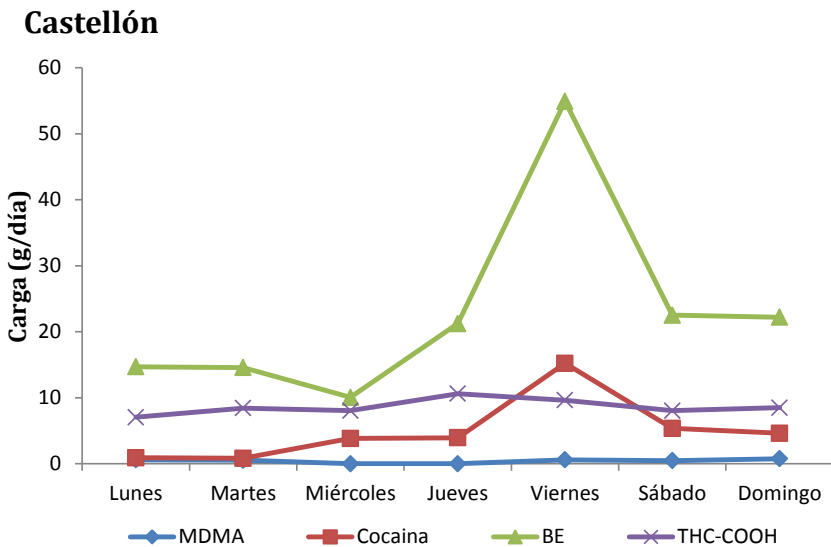


Figura 4.17 Carga diaria de drogas (g/día) en las aguas residuales de Castellón

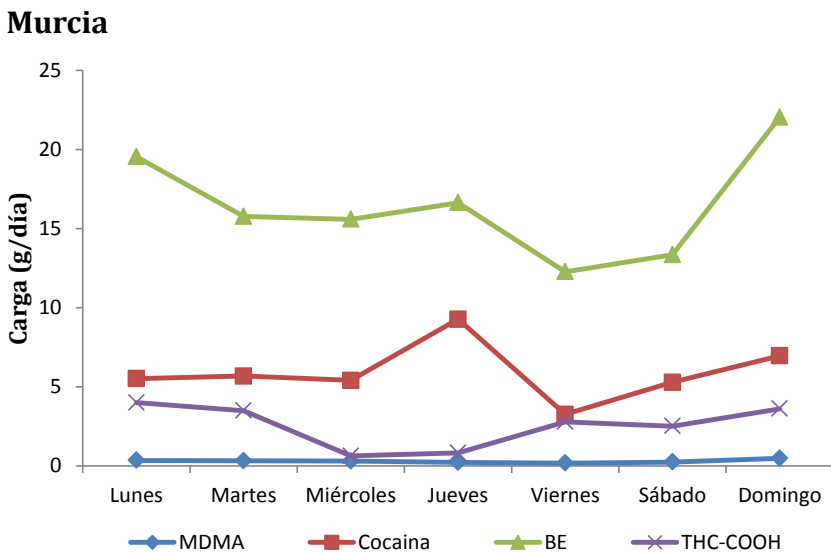


Figura 4.18 Carga diaria de drogas (g/día) en las aguas residuales de Murcia

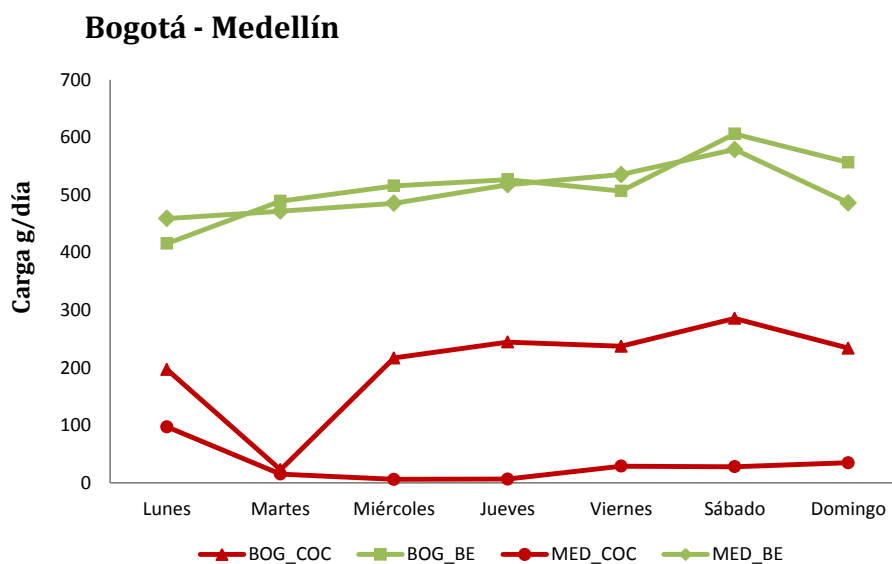


Figura 4.19 Carga diaria de cocaína y BE (g/día) en las aguas residuales de Bogotá y Medellín

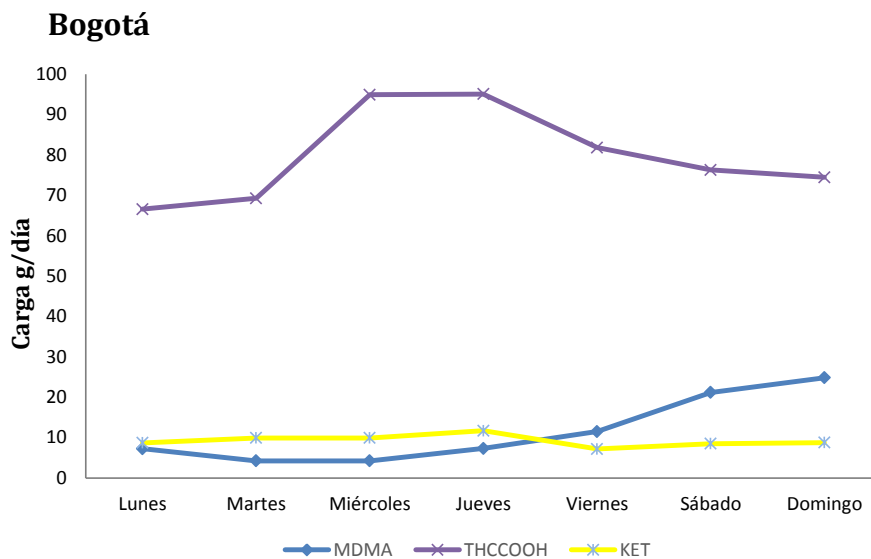


Figura 4.20 Carga diaria de MDMA, THC-COOH y ketamina (g/día) en las aguas residuales de Bogotá

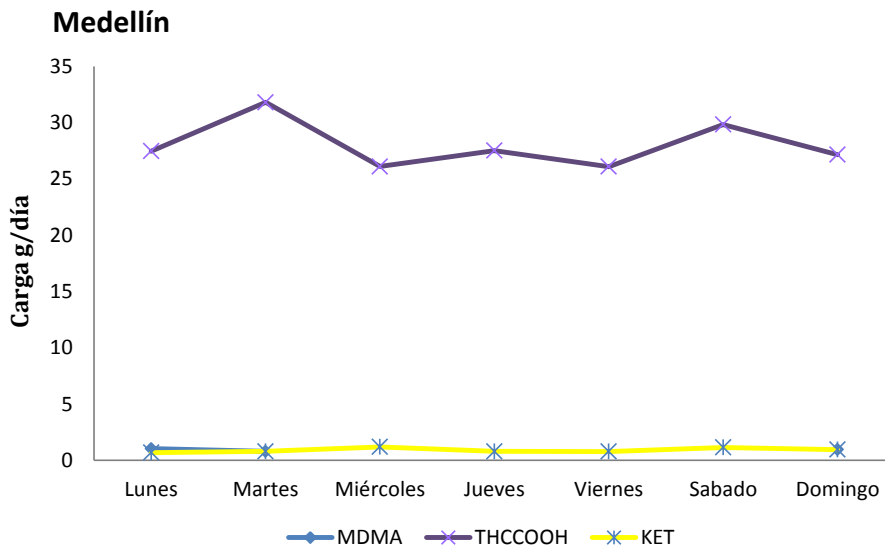


Figura 4.21 Carga diaria de MDMA, THC-COOH y ketamina (g/día) en las aguas residuales de Medellín

A partir de los datos de carga diaria (**Figuras 4.17-4.21**) se puede observar la evolución semanal en cuanto a presencia de drogas en las aguas residuales. En general, se aprecia un incremento significativo de los niveles de cocaína y BE en los fines de semana, siguiendo ambos compuestos una evolución bastante similar. Esto indicaría que el consumo de cocaína aumenta notablemente los fines de semana. Este aumento no es tan acusado en las ciudades Colombianas, lo que indicaría que su consumo es bastante constante a lo largo de toda la semana, aunque se produce un ligero aumento en las aguas del Sábado y del Domingo. Sin embargo, la otra droga más abundante en las aguas, THC-COOH, no parece aumentar significativamente los fines de semana, manteniéndose bastante estable a lo largo de toda la semana, lo que indicaría que los consumidores de esta droga la toman de forma habitual todos los días. En cuanto al éxtasis, no parece existir una tendencia clara a lo largo de la semana. La ketamina sólo se ha detectado en las aguas de Bogotá y Medellín, y a bajos niveles de concentración. Con los datos disponibles, no se llega a apreciar una evolución clara semanal.

Para poder comparar de modo realista las cargas diarias de drogas en las aguas residuales entre distintas ciudades es necesario normalizar los datos considerando el número estimado de habitantes que vierten sus aguas en cada población. De este modo, se pueden obtener las cargas diarias expresadas en mg/día/1000 habitantes, dato que es comparable entre las distintas ciudades. Los resultados normalizados por cada 1000 habitantes se encuentran en la **Tabla 4.8.** y se han obtenido del siguiente modo:

$$\text{mg/día/1000 hab} = \frac{\text{g/día} \times 1000 \text{ (hab)} \times 1000 \text{ mg/g}}{\text{n}^{\circ} \text{ hab (Tabla 4.5)}}$$

Para estimar el consumo de drogas por parte de la población, es necesario tener en cuenta el metabolismo y excreción de las mismas, a través de la orina principalmente. A partir de los datos de carga diaria total (g/día), y aplicando factores de corrección para cada uno de los biomarcadores analizados en las aguas, en función de los datos de excreción, se puede estimar el consumo de drogas de una manera aproximada.

Según el estudio realizado por Castiglioni, 2013, los datos más completos sobre metabolismo son para la cocaína. Se conoce que su principal metabolito es la BE, y que los porcentajes de excreción en orina varían en función de la forma en que se consume (esnifada, fumada, intravenosa, oral). El valor medio de excreción de BE propuesto por estos autores es 29% de la dosis de cocaína tomada, con una variabilidad expresada como RSD del 26%. Estos valores conducen a un factor de corrección de 3.59, que es el que se ha tomado en el presente trabajo para transformar los datos de BE en cocaína consumida (Cocaína = BE x 3.59).

Ciudad	Compuesto	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Castellón	Cocaína	5.0	4.5	21.1	21.7	84.2	29.7	25.6
	Benzoilecgonina	81.3	80.6	55.6	117.5	303.9	124.6	122.9
	MDMA	3.3	2.9			3.3	2.5	4.1
	THC-COOH	39.0	46.6	44.5	58.8	53.2	44.5	47.0
Murcia (Molina de segura Norte)	Cocaína	78.1	80.5	76.5	131.1	46.1	74.8	98.6
	Benzoilecgonina	276.3	223.0	220.5	235.3	173.7	188.8	311.8
	MDMA	4.9	4.5	4.2	3.1	2.5	3.5	6.8
	THC-COOH	56.6	49.4	8.9	11.7	39.5	35.5	51.1
Bogotá	Cocaína	78.8	9.1	86.7	97.8	94.8	114.2	93.5
	Benzoilecgonina	166.2	195.7	206.3	210.7	202.8	242.5	222.6
	MDMA	2.9	1.7	1.7	2.9	4.6	8.5	9.9
	THC-COOH	26.6	27.7	38.0	38.1	32.7	30.5	29.8
	Ketamina	3.5	4.0	4.0	4.7	2.9	3.4	3.5
Medellín	Cocaína	162.0	25.2	9.9	10.5	48.0	46.5	57.9
	Benzoilecgonina	2540.5	786.4	809.4	863.0	892.7	965.2	810.5
	MDMA	1.7	1.3	-	-	-	-	1.6
	THC-COOH	45.7	53.0	43.5	45.9	43.5	49.7	45.3
	Ketamina	1.1	1.3	2.0	1.3	1.3	1.9	1.6

Tabla 4.8 Carga diaria normalizada de drogas en las aguas residuales (expresada en mg/día/1000 habitantes) en cada una de las ciudades objeto de estudio.

Para el resto de drogas analizadas en el agua residual, no existen datos suficientemente sólidos sobre su metabolismo, por lo que los datos normalizados que se pueden comparar con otros trabajos son los referidos a las cargas diarias expresadas como mg/día/1000h, sin aplicar ningún factor de corrección. En esta Tesis, en línea con los estudios realizados en Europa por el grupo SCORE, no se ha aplicado ningún factor de corrección para MDMA, THC-COOH y ketamina. En consecuencia los datos a comparar serán los de la **Tabla 4.8**, en cuanto a MDMA, THC-COOH y ketamina. En cuanto a la cocaína, se pueden comparar las cargas diarias normalizadas de BE en agua residual (datos de la **Tabla 4.8**), o bien los datos estimados sobre su consumo teniendo en cuenta su excreción como BE (factor de corrección 3.59). Estos datos de cocaína consumida, estimados a partir de las cargas de BE en el agua residual, se encuentran en la **Tabla 4.9**.

Tabla 4.9 Estimación del consumo de cocaína (mg/día/1000 habitantes) a través de las cargas diarias de su principal metabolito benzoilecgonina en aguas residuales (29%, excreción media de cocaína como BE; factor de corrección 3.59) (Castiglioni, 2013; Ort, 2014).

Día	Castellón	Murcia	Bogotá	Medellín
Lunes	291.9	992.1	596.7	2746.7
Martes	289.5	800.7	702.7	2823.1
Miércoles	199.7	791.5	740.7	2905.7
Jueves	422.0	844.8	756.6	3098.2
Viernes	1091.2	623.5	728.0	3204.6
Sábado	447.4	677.8	870.7	3465.1
Domingo	82.1	1119.5	799.1	2909.8
Media semanal	546	836	742	3022

Los resultados obtenidos sobre estimación del consumo de cocaína se muestran en la **Figura 4.22**. Las **Figuras 4.23** (Cannabis), **Figura 4.24** (MDMA) y **Figura 4.25** (ketamina) muestran las cargas diarias normalizadas para el resto de drogas analizadas.

Con los datos normalizados (**figura 4.22**) se puede observar que el consumo medio estimado para Castellón (550 mg/día/1000h) y Murcia (840) es semejante a los valores encontrados en estudios realizados en 2011 (Thomas, 2012) para ciudades españolas, donde se reportaron valores alrededor de 500 mg/día/1000h para Santiago de Compostela y de 1.000 para Castellón, y son inferiores a los consumos estimados para Barcelona y Valencia, con valores alrededor de 1.200 y 1.400 respectivamente. El consumo en Bogotá parece estar también en esta misma línea (740), por debajo de ciudades europeas como Amberes o Ámsterdam, en donde el consumo estimado de cocaína llega hasta casi 2.000 mg/día/1000h. Sin embargo, Medellín está por encima de todas las ciudades europeas incluidas en el estudio de 2012 (Thomas, 2012), con un valor medio estimado de 3.000 mg/día/1000h.

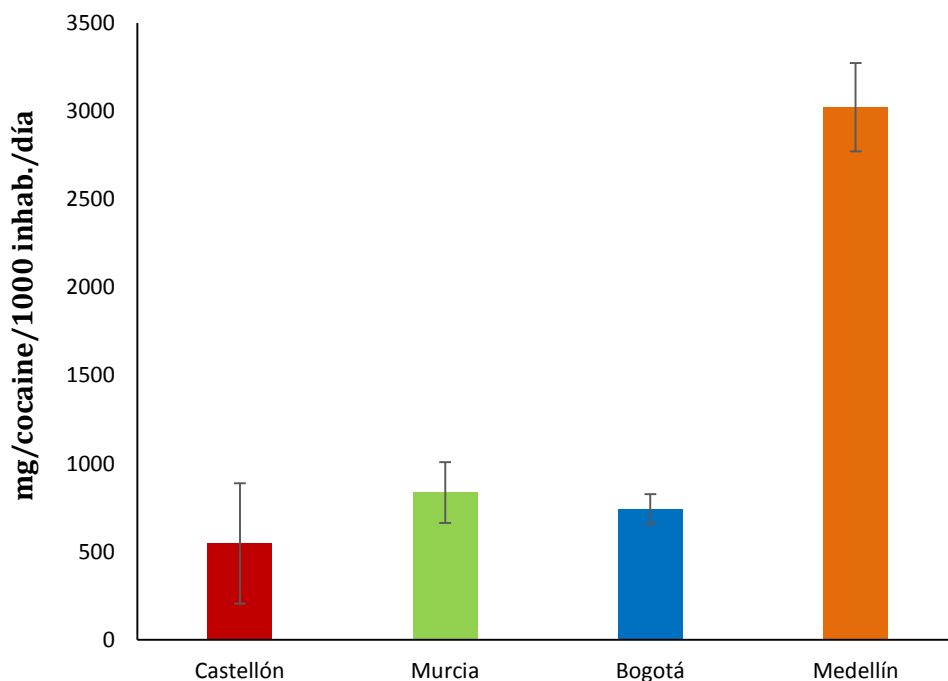


Figura 4.22 Estimación del consumo medio de cocaína a lo largo de una semana, calculado a partir de la carga de BE en el agua residual (valor medio semanal \pm SD, n=7). Muestras de Castellón tomadas entre 25 y 31 de Marzo 2015; Murcia, 15-21 Abril 2015; Bogotá, 10-16 Marzo 2015; Medellín, 27 Junio-3 Julio, 2015.

También es posible comparar las cargas medias de BE (mg/día/1000h) entre diversas ciudades. En este caso, no se aplica el factor de 3.59, sino que directamente se usan los valores normalizados de BE. Así, es posible comparar nuestros datos con los reportados por (Ort, 2014) en el amplio estudio realizado en 42 ciudades de 21 países europeos. Según estos datos, los resultados obtenidos en Castellón en 2014 (carga media de BE 126 mg/día/1000 h) son ligeramente inferiores a los encontrados en 2011–2013, con cargas medias entre 200 y 380, y son del mismo orden de ciudades como Zagreb, Oslo o Lisboa. Los valores medios encontrados en Murcia (233) y Bogotá (207) son semejantes a los de ciudades europeas como París Milán, Bruselas o Santiago de Compostela, pero inferiores a los de Valencia, Barcelona, Zúrich, Ámsterdam y Londres, todos ellos por encima de 400. Cabe destacar que la carga media de BE en Medellín (845) es muy superior a la de las ciudades Europeas, con la única excepción del valor encontrado en Amberes en 2013 que fue del mismo orden.

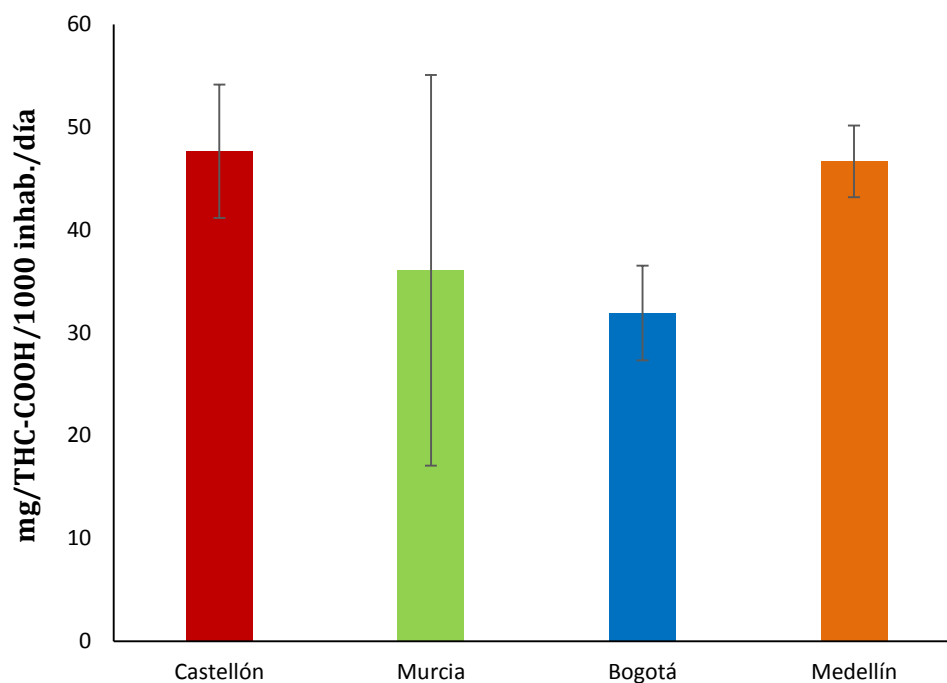


Figura 4.23 Cargas medias normalizadas de THC-COOH en aguas residuales (expresadas en mg/día/1000 habitantes) a lo largo de una semana (valor medio semanal \pm SD, $n=7$). Muestras de Castellón tomadas entre 25 y 31 de Marzo 2015; Murcia, 15-21 Abril 2015; Bogotá, 10-16 Marzo 2015; Medellín, 27 Junio-3 Julio, 2015.

En cuanto al cannabis (**figura 4.23**), las cargas medias encontradas para su biomarcador THC-COOH en las aguas residuales fueron muy semejantes en las cuatro ciudades estudiadas (Castellón 49; Murcia 33; Bogotá 33; Medellín 47, expresadas en mg/día/1000h). Estos valores son del mismo orden que los encontrados en Milán, Bratislava, Sarajevo, Zagreb, Amberes, Bruselas, Praga, Valencia y Castellón (2013), pero inferiores a los reportados en Barcelona, París, Eindhoven y Utrecht, todos ellos con valores próximos o ligeramente superiores a 100. Los valores más altos reportados para THC-COOH corresponden a Ámsterdam (próximos a 200), ciudad que es conocida por su política liberal en el consumo de cannabis.

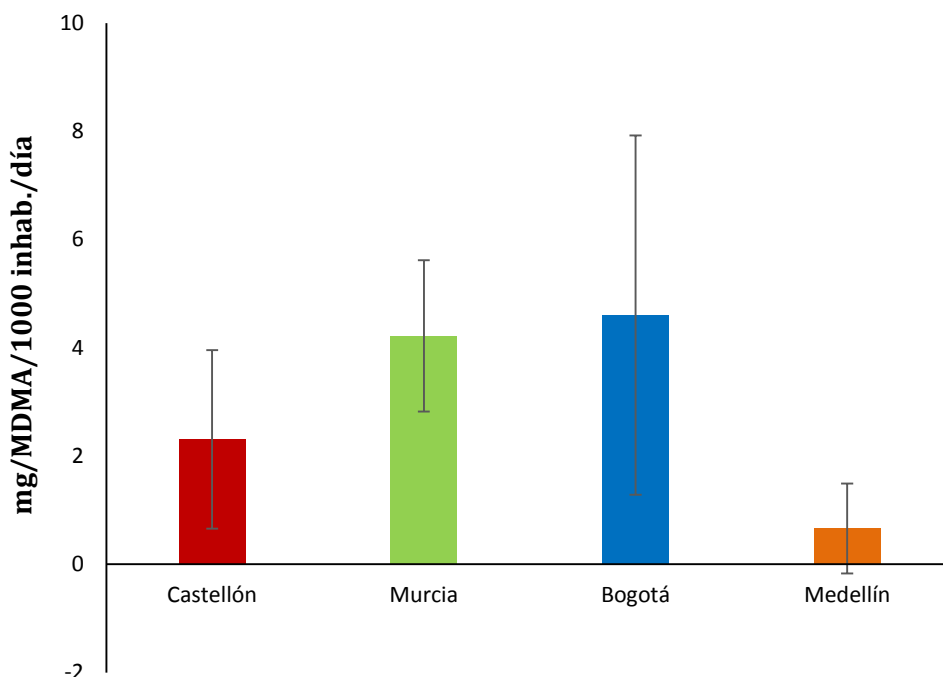


Figura 4.24 Cargas medias normalizadas de MDMA en aguas residuales (expresadas en mg/día/1000 habitantes) a lo largo de una semana (valor medio semanal \pm SD, $n=7$). Muestras de Castellón tomadas entre 25 y 31 de Marzo 2015; Murcia, 15-21 Abril 2015; Bogotá, 10-16 Marzo 2015; Medellín, 27 Junio-3 Julio, 2015.

Las cargas medias de MDMA (**figura 4.24**) son bajas en comparación con las de cannabis y BE, y semejantes en las cuatro ciudades, con valores medios entre 1.5 y 4.4 mg/día/1000h. Estos valores están en la línea de los reportados en ciudades como Zagreb, Milán, Oslo, Valencia, Castellón o Santiago, entre otras ciudades, y son significativamente inferiores a los reportados en Barcelona, Amberes, Zúrich, Londres o Ámsterdam, ciudades en las que frecuentemente se superan los 30 mg/día/1000h. Los valores más altos corresponden a ciudades holandesas como Ámsterdam, Utrecht e Eindhoven, con cargas medias entre 80 y 100.

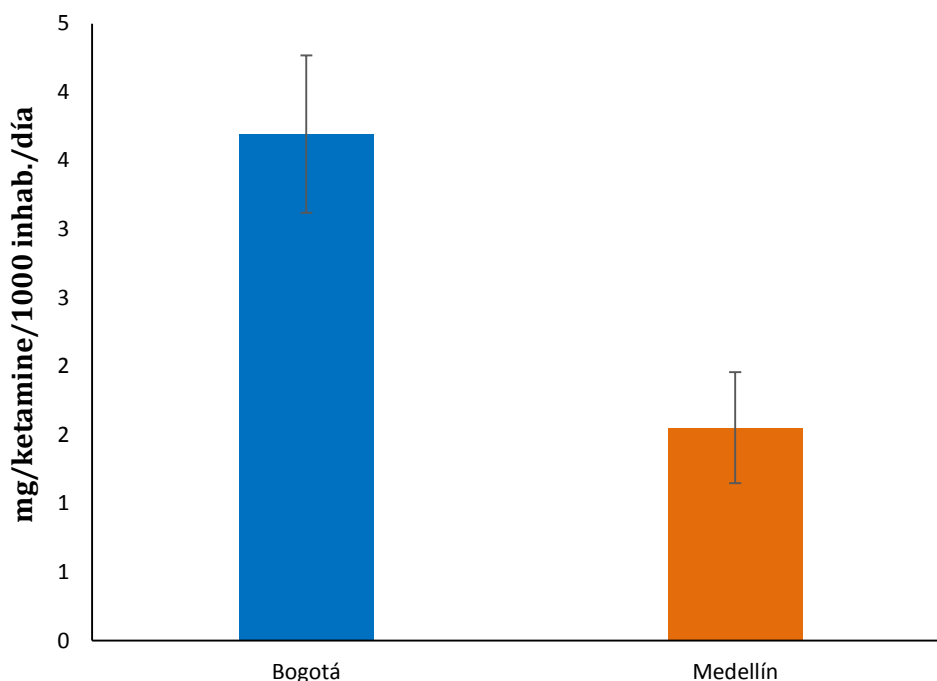


Figura 4.25 Cargas medias normalizadas de ketamina en aguas residuales (expresadas en mg/día/1000 habitantes) a lo largo de una semana (valor medio semanal \pm SD, $n=7$). Muestras de Bogotá tomadas entre el 10-16 Marzo 2015; y Medellín, 27 Junio-3 Julio, 2015.

La ketamina (**figura 4.25**) tan sólo se detectó en las aguas de Colombia, en las dos ciudades estudiadas Bogotá y Medellín, con valores medios de 3.8 y 1.5 mg/día/1000h,

respectivamente. Esta detección es significativa, pues la ketamina comúnmente se utiliza como anestésico suave de uso hospitalario y veterinario. Sin embargo, también se puede utilizar como droga de abuso, pues este compuesto es capaz de alterar la conciencia, produciendo un estado de leve embriaguez hasta las más impactantes vivencias de textura onírica y auténticamente alucinatoria, pudiendo, incluso, desencadenar experiencias cercanas a la muerte y fenómenos de desdoblamiento corporal. En cualquier caso, parece ser que puede producir experiencias psicodélicas de gran intensidad.

Esta sustancia se consume como droga de uso recreativo en ámbitos relacionados con la música electrónica, donde se le conoce como K, keta, especial K, heroína techno o cocaína de los ángeles. También suele mezclarse con la cocaína en polvo y esnifarse. Esta combinación recibe el nombre de "Special Calvin Klein" (National Institute Drugs Abuse, 2013). Se puede presentar en forma líquida, como clorhidrato de ketamina, la cual suele inyectarse por vía intravenosa, o en forma de polvo, utilizándose directamente como la cocaína, en forma de raya para esnifar (Info-drogas, 2014).

No se han encontrado en la bibliografía datos sobre cargas medias de ketamina en las aguas residuales, por lo que no resulta viable una comparación de nuestros datos con otros reportados previamente.

Conclusiones



De los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral se puede extraer, como **conclusión general**, que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) tiene un excelente potencial para la determinación (cuantificación y confirmación) de residuos de plaguicidas en muestras alimentarias y medioambientales. Esta técnica aporta una gran selectividad y sensibilidad a los métodos desarrollados y permite controlar los niveles de plaguicidas en alimentos en cumplimiento con la legislación vigente en lo relativo a Límites Máximos de Residuos (MRLs). Asimismo, sus excelentes prestaciones permiten la determinación de bajas concentraciones de estos compuestos y otros contaminantes orgánicos en el medio ambiente con especial énfasis en compuestos de polaridad media-alta, detectando posibles situaciones de contaminación que afectan a la calidad del medio ambiente

En cuanto a las **conclusiones específicas** relacionadas con el trabajo llevado a cabo, destacan las siguientes:

1. La metodología analítica multirresidual desarrollada en esta Tesis, basada en LC-MS/MS QqQ, es la más amplia reportada hasta la fecha para plaguicidas en frutas tropicales. El número de analitos (incluyendo algunos metabolitos relevantes) y de matrices tropicales (12 en total) ha sido el más numeroso estudiado hasta el momento. Las frutas tropicales se han seleccionado entre las de mayor consumo interno en Colombia y/o más exportadas por este país, principalmente a la EU, y correspondieron a uchuva, maracuyá, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya, granadilla, lulo, carambolo, feijoa, mangostán y guayaba.
2. Los dos métodos desarrollados en esta Tesis para determinar residuos de plaguicidas en frutas tropicales pueden considerarse complementarios, con tratamientos de muestra bien conocidos y ampliamente usados, como extracción con disolventes (Ultraturrax) y procedimiento QuEChERS. Las adecuadas recuperaciones obtenidas en la validación, la precisión (repetibilidad), y la adquisición de dos transiciones MS/MS por compuesto junto con la evaluación de las relaciones iónicas, garantizan la correcta aplicación de esta metodología a distintos tipos de muestras. Los límites de cuantificación objetivo (menor nivel validado), de 0.05 y 0.01 mg/kg en función del

método utilizado, posibilitan la utilización de esta metodología para el control de cumplimiento de MRLs en frutas tropicales destinadas a la exportación.

3. Se han aplicado dos aproximaciones sencillas, pero eficaces, para la corrección del efecto matriz en el análisis de frutas tropicales mediante LC-MS/MS basadas en la comparación de respuestas en calibrados realizados en solvente y en matriz: 1) calibrado en matriz, agrupando varios tipos de muestras y escogiendo una de ellas como matriz representativa para la preparación de la curva de calibrado; 2) calibrado en solvente, aplicando factores de corrección para cada combinación analito/matriz, basados en las diferencias de pendientes entre calibrado en matriz y calibrado en solvente. Ambas aproximaciones han demostrado ser útiles, y los resultados han sido convenientemente validados, siendo de fácil implementación en los laboratorios de rutina especializados en ARP.
4. Los análisis realizados en frutas tropicales de origen colombiano, tanto recogidas en España como directamente en Colombia, han demostrado la presencia de algunos de los plaguicidas estudiados, normalmente a niveles inferiores al MRL. El compuesto más frecuentemente encontrado, y a mayores concentraciones, fue el fungicida carbendazima. La gran mayoría de positivos se encontraron por debajo de 0.2 mg/kg. Los MRLs establecidos por la Unión Europea se superaron en seis ocasiones: carbendazima en cuatro muestras (papaya, lulo, granadilla, maracuyá), dimetoato en una muestra de maracuyá, y diuron en una muestra de uchuva. Cabe destacar que, de los seis casos en los que se superó el LMR, en cinco de ellos este valor corresponde al límite de determinación del método analítico, lo cual denota la falta de estudios BPLs de residuos para muchas frutas tropicales.
5. En colaboración con el INTA (Balcarce, Argentina), se ha desarrollado metodología mutirresidual para plaguicidas seleccionados en suelos procedentes de Argentina, con el fin de que sea implementada en los laboratorios de dicha institución. Después de una extracción con acetonitrilo, usando agitación mecánica seguida de ultrasonidos, ha sido posible la determinación cuantitativa de 18 plaguicidas en diferentes tipos de suelos usando calibrado en solvente sin efecto matriz apreciable. La metodología desarrollada es robusta y suficientemente sensible, con un LOQ objetivo de 0.05 mg/kg para todos los plaguicidas estudiados. Se ha probado en un buen número de

suelos de muy diferentes características físico-químicas, incluyendo muestras control de calidad para cada suelo analizado, obteniendo recuperaciones satisfactorias.

6. La determinación de residuos del conocido herbicida glifosato (GLY) y su metabolito AMPA en suelos latinoamericanos (Colombia y Argentina) ha resultado muy problemática. Ha sido necesario mejorar la metodología existente, basada en LC-MS/MS previa derivatización con FMOC, debido a las características diferenciales de estos suelos y al fuerte efecto matriz observado, con una drástica supresión de la señal analítica. El estudio detallado y la optimización de la etapa de *clean-up* mediante SPE, con atención especial al tipo de cartuchos y al pH del extracto del suelo, ha sido fundamental para la obtención de resultados satisfactorios.
7. Además del adecuado tratamiento de muestra en la determinación de glifosato y AMPA en suelos, es primordial la adquisición del mayor número de transiciones posibles para cada analito debido a las interferencias observadas. La confirmación de la identidad del GLY en los suelos analizados fue complicada, ya que la transición q1 parecía estar interferida en varias de las muestras positivas. Afortunadamente, el uso de la transición q3 permitió una confirmación fiable en todas las muestras. La situación del AMPA fue aún más problemática en términos de confirmación, ya que sólo estaban disponibles dos transiciones, y una de ellas parecía estar interferida en la mayoría de las muestras. A partir de la evaluación de los datos obtenidos en suelos, para la confirmación de la identidad del compuesto detectado se sugiere un aumento en la tolerancia en las relaciones iónicas (Q/q ratio) de hasta el 50%, en lugar del 30% aceptado por las guías SANCO, dadas las características especiales y dificultades asociadas a la determinación de glifosato en suelos.
8. Los análisis realizados en suelos de zonas agrícolas de Colombia y Argentina demostraron la presencia de estos dos compuestos en la mayoría de ellos. El GLY se detectó en 13 de los 15 suelos colombianos, alcanzando un valor máximo de 3.8 mg/kg, con niveles superiores a 1 mg/kg en nueve de ellos. El metabolito AMPA se detectó también en 13 suelos de Colombia, pero a menor concentración, con un valor máximo de 2.1 mg/kg y con tres suelos por encima de 1 mg/kg. Los niveles en los suelos argentinos estuvieron, en general, por debajo de los de Colombia.

9. Se ha desarrollado un nuevo método para la determinación directa de residuos de glifosato en cereales y soja. Después de probar varias columnas y condiciones cromatográficas, la columna *mix-mode* Obelisc N (tipo anfotérico, con grupos aniónicos cerca de la superficie de la fase estacionaria separados de los grupos catiónicos por una cadena hidrofílica) fue la que aportó mayor retención cromatográfica para el GLY haciendo posible su análisis directo sin necesidad de derivatización con FMO. Aunque los resultados fueron satisfactorios en términos de recuperación, precisión y límites de cuantificación objetivo (todos menores al MRL de cada producto), la columna presentó poca robustez, con una rápida degradación, que se tradujo en una paulatina pérdida de retención del GLY. Este hecho, junto al elevado coste de estas columnas, hace que esta metodología no sea recomendable, por el momento, en análisis de rutina.
10. En los métodos desarrollados para glifosato en suelos y en vegetales (especialmente en soja y maíz) fue necesario el uso de patrón interno marcado isotópicamente (^{13}C , ^{15}N GLY) para una correcta cuantificación. El patrón interno permitió corregir el efecto matriz que aún persistía en la mayoría de los casos a pesar del tratamiento de muestra aplicado, así como posibles variaciones originadas a lo largo del procedimiento.
11. El uso del analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) ha permitido realizar un estudio detallado de algunas interferencias observadas, tanto en el caso del análisis de plaguicidas en frutas tropicales como en el de glifosato en suelos. La adquisición del espectro completo en masa exacta ha permitido distinguir interferencias de compuestos de la matriz que compartían algunas transiciones con los analitos, y que podrían dar lugar a falsos positivos (existencia de pico cromatográfico al mismo tiempo de retención) o falsos negativos (no cumplimiento del ion-ratio). Ante esta situación, se recomienda la adquisición del mayor número posible de transiciones para cada compuesto, con el fin de disponer de alternativas en caso de interferencias.
12. La aproximación utilizada en *Wastewater-Based Epidemiology* (WBE) ha sido de utilidad para estimar el uso de drogas por parte de la población a través del análisis de aguas residuales. Los resultados de esta Tesis han permitido conocer que el

consumo de cocaína en la ciudad de Medellín (estimado a partir de los niveles de concentración de su principal metabolito benzoylecgonina (BE) y de los datos medios de excreción en orina) parece ser muy superior al de Bogotá y al de las dos ciudades españolas estudiadas, Murcia y Castellón. Los datos obtenidos sobre el principal biomarcador de cannabis, THC-COOH, y sobre MDMA y ketamina, también han permitido la comparación con otras ciudades europeas usando las cargas medias normalizadas en las aguas, expresadas en mg/día/1000 habitantes.

13. En general, se observa un incremento significativo de los niveles de cocaína y BE en los fines de semana, siguiendo ambos compuestos una evolución bastante similar, lo cual parece indicar que el consumo de cocaína aumenta notablemente de viernes a domingo. Este hecho no es tan acusado en las ciudades colombianas, lo que indicaría que su consumo es relativamente constante a lo largo de toda la semana. Sin embargo, las cargas de THC-COOH en las aguas residuales no parecen aumentar significativamente los fines de semana, manteniéndose bastante estable a lo largo de toda la semana, lo que indicaría que los consumidores de esta droga la toman de forma habitual todos los días. En cuanto al éxtasis, no parece existir una tendencia clara a lo largo de la semana.
14. Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral son los primeros reportados en la bibliografía sobre estimación del consumo de drogas en Colombia a través del análisis de aguas residuales.

The **general conclusion** from the work performed in this Thesis is that Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry LC-MS/MS with tripe quadrupole (QqQ) has strong potential for the determination (quantification and identification/confirmation) of pesticide residues in environmental and food samples. The excellent sensitivity and selectivity of this technique make possible monitoring the compliance of maximum residue limits (MRLs) for pesticides in food. Not only pesticides can be determined by LC-MS/MS at low concentrations, but also many other organic pollutants of medium-high polarity, as for example most of emerging contaminants (e.g. illicit drugs), in the aquatic environment.

The most relevant **specific conclusions** derived from the work carried out are the following:

1. The LC-MS/MS QqQ multi-residue methodology developed in this Thesis is the widest reported until now for pesticides in tropical fruits. The number of analytes (including several metabolites) and tropical matrices (12 in total) are the highest studied up to the moment. Tropical fruits selected are frequently consumed in Colombia and widely exported to other countries, mainly to the EU, and corresponded to uchuva, maracuyá, pitahaya, tamarillo, gulupa, papaya, granadilla, lulo, carambolo, feijoa, mangostán y guayaba.
2. The two methods developed for pesticide residues in tropical fruits can be considered as complementary, and they apply well-known sample treatments such as extraction with solvents (Ultraturrax) and the QuEChERS procedure. The satisfactory recoveries and precision obtained in method validation, together with the acquisition of two MS/MS transitions and the evaluation of ion intensity ratios, guarantee the correct application of that methodology to real-world samples. The objective limits of quantification (lowest level validated) were 0.05 and 0.01 mg/kg as a function of the method applied, and were low enough to monitoring the compliance of the MRLs in tropical fruits exported to the EU.
3. Two different approaches have been applied for matrix effects correction in the LC-MS/MS pesticide residue analysis of tropical fruits, based on the comparison of responses between calibration in solvent and in matrix: 1) calibration in matrix, grouping several matrix samples and selecting one of them as representative for all of

them in order to prepare the calibration curve; 2) calibration in solvent, applying correction factors for each analyte/matrix combination on the basis of the differences in slopes between calibration in matrix and in solvent. Both approaches have been shown to be efficient for a reliable quantification, and are of easy application in laboratories in the field of pesticide residue analysis. The results obtained by both approaches have been properly validated, and have been applied to real-world samples including numerous QCs.

4. Analysis of tropical fruits from Colombia (both domestic and export samples) have shown the presence of several pesticides under study, commonly at concentrations below the MRL. The most detected compound and also found at higher concentrations was the fungicide carbendazime. Nearly all positives were below 0.2 mg/kg, and the MRL established in the EU were exceeded in 6 occasions: carbendazime in four samples (papaya, lulo, granadilla, maracuyá), dimethoate in one maracuyá sample, and diuron in one uchuva sample. It is worth noticing that 5 out of 6 cases of non-compliance of MRL corresponded to cases where this parameter was set-up by default at the limit of determination of the method. This fact illustrates the need to perform GLP residue trials for tropical fruits to set-up realistic MRLs.
5. Multi-residue LC-MS/MS QqQ methodology has been developed for soils from Argentina in a collaborative study carried out together with INTA (Balcarce, Argentina), with the objective to implement such methodology in the INTA's laboratories. After extraction with acetonitrile with mechanical shaking followed by ultrasons, the determination of 18 pesticides has been feasible in rather different soil types using calibration in solvent without relevant matrix effects. The methodology developed showed satisfactory robustness and sensitivity, with an objective LOQ of 0.05 mg/kg for all pesticides included in the method. It was tested to a notable number of soils of very different physico-chemical characteristics, including QC samples for each soil analysed, obtaining satisfactory results.
6. The residue determination of GLY and its main metabolite AMPA in soils from Latino America (Colombia and Argentina) has been highly problematic. The particular characteristics of these soils made necessary an improvement of the analytical methodology developed by our group, based on LC-MS/MS determination previous

derivatization with FMOC, in order to reduce the strong matrix effects observed (drastic ionization suppression). It was necessary to apply an additional clean-up step by SPE, with special attention to the type of cartridges used and the pH of the soil extract, in order to get satisfactory results.

7. In addition to the sample treatment applied for the determination of GLY and AMPA in soils, it was of great importance the acquisition of all transitions available for each analyte due to the isobaric interferences observed. Confirmation of the identity of GLY detected in soils was troublesome as the transition q_1 was interfered in several samples. Luckily, it was possible to use another transition (q_3) to confirm its identity based on compliance of the Q/q ratios. The confirmation of AMPA was even more problematic, as only two transitions were available and one of them was interfered in many samples. From data obtained in this work, we suggested an increase in the tolerance of Q/q ratios up to 50%, instead of 30% established by SANCO guidelines, due to the particular characteristics and difficulties observed in the residue determination of GLY in soils.
8. Analysis performed in agricultural soils from Colombia and Argentina showed the presence of these compounds in most of samples. GLY was detected in 13 out of 15 soils from Colombia, reaching a maximum concentration of 3.8 mg/kg, with values above 1 mg/kg in 9 of these soils. The metabolite AMPA was also detected in 13 soils from Colombia, although at lower concentrations, with a maximum value of 2.1 mg/kg, and 3 soils above 1 mg/kg. Concentrations of GLY and AMPA in soils from Argentina were in general lower than in those from Colombia.
9. A new analytical method has been developed for the direct determination of GLY residues in cereals and soya. After testing different chromatographic columns designed for polar compounds, the mix-mode Oblisc N column (amphoteric, with anionic groups close to the surface of the stationary phase separated from the cationic groups by an hydrophilic chain) led to the best results in term of chromatographic retention for GLY, making possible the direct determination of this herbicide without derivatization with FMOC. Satisfactory results were obtained for recoveries, precision and limits of quantification objective (all below to the MRLs); however, this column showed poor robustness and rapid degradation with its use, with a notable decrease

in the retention time of GLY. This fact, together with the high cost, make this methodology not much appropriate for routine analysis at the moment, unless new similar columns, but more robust and cheaper, are available.

10. In the methods developed for GLY residues in soils and vegetables (especially in soya and maize), the use of isotope-labeled internal standard (^{13}C , ^{15}N GLY) was required for correct quantification. This ILIS allowed the correction of matrix effects still remaining after sample treatment, as well as potential variations occurring along the procedure.
11. The use of LC-QTOF MS has allowed an in depth study of some interferences observed in the methods developed for pesticides in tropical fruits and for GLY in soils. The information contained in accurate-mass full-spectrum QTOF acquisition was essential to distinguish isobaric interferences that shared some transitions with the analytes. These interferences might lead to report false negatives (non-compliance of Q/q ratios) and/or false positives (a chromatographic peak at the same retention time) if not properly removed or distinguished. Under this situation, the acquisition of as many as possible MS/MS transitions for each compound was recommended to have alternative measurements in case of interferences.
12. The Wastewater-Based Epidemiology (WBE) approach has been of great help to estimate the drug use from the analysis of wastewater samples. Data obtained in this Thesis revealed that cocaine consumption in Medellin (estimated from the concentration of its major metabolite benzoylecgonine (BE) and from excretion data in urine) seems much higher than in Bogotá and in the two Spanish cities under study, Murcia and Castellón. Data obtained on the main biomarker of cannabis, THC-COOH, and on MDMA and ketamine also allowed the comparison with other European cities using the normalized drug loads in wastewater, expressed as mg/day/1000 inhabitants.
13. A general trend was observed towards the increase of cocaine and BE during the weekends, with both compounds following similar concentration pattern. This would reveal that cocaine consumption increases on weekends, a fact that was not much significant in the Colombian cities of Bogotá and Medellin. The latter might be

interpreted as the consumption of cocaine was rather similar along the overall week in these towns. However, loads of THC-COOH in wastewater did not increase significantly on weekends. This would reveal that cannabis is commonly consumed every day, with not much increase on weekends. No clear trend was observed in the loads of MDMA along the week.

14. Data obtained in this Thesis are the first reported in the scientific literature on estimation of drug use in Colombia using the Wastewater-Based Epidemiology approach.

Bibliografia



- Agroindustria, 2014. Oportunidades de Negocio en el Sector Agrícola. Disponible en: <http://www.colombiatrade.com.co/oportunidades/sectores/agroindustria/agricola>. Acceso, 30 Mayo 2014.
- Ahmadi, K., Abdollahzadeh, Y., Asadollahzadeh, M., Hemmati, A., 2015. Chemometric assisted ultrasound leaching-solid phase extraction followed by dispersive-solidification liquid – liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in soil samples. *Talanta* 137, 167–173.
- Albaseer, S.S., Nageswara Rao, R., Swamy, Y. V., Mukkanti, K., 2010. An overview of sample preparation and extraction of synthetic pyrethroids from water, sediment and soil. *J. Chromatogr. A* 1217, 5537–5554.
- Albers, C.N., Banta, G.T., Hansen, P.E., Jacobsen, O.S., 2009. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil-comparing different soils and humic substances. *Environ. Pollut.* 157, 2865–70.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B., 2006. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 838–865.
- Alpert, A., 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A* 499, 177 – 196.
- Amarante, O., Rodrigues, T., 2002. Metodos de extracao e determinacao do herbicida glifosato:Breve revisao. *Quim. Nov.* 25, 420–428.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412–431.
- Anastassiades, 2013. Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination. EURL-SRM 1–44.

- Andreu, V., Picó, Y., 2004. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 772–789.
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479.
- Antignac, J.P., De Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., Le Bizec, B., 2005. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal. Chim. Acta* 529, 129–136.
- Antoniou, M., Brack, P., Carrasco, A., Fagan, J., Habib, M., Kageyama, P., Leifert, C., Nodari, R.O., Pengue, W., 2010. Soja Transgénica ¿Sostenible? ¿Responsable? [WWW Document]. URL http://www.gmwatch.org/files/GMsoy_Sust_Respons. Acceso 5 Julio 2014.
- AOAC, 2007. AOAC Official Method 2007 . 01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–1873.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R., Abarkeli, R.B., 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799–804.
- Arias, J.L.D.O., Rombaldi, C., Caldas, S.S., Primel, E.G., 2014. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1360, 66–75.
- Arkan, T., Molnár-Perl, I., 2015. The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography. *Microchem. J.* 121, 99–106.

- Assis, E., Silva, A., Barbosa, L., Queiroz, M., D'Antonino, L., GonCalves, V., 2011. Optimization and validation of the solid-liquid extraction technique for determination of Picloram in soils by high performance liquid chromatography. *Planta Daninha*. 29, 683–696.
- Aulagnier, F., Poissant, L., Brunet, D., Beauvais, C., Pilote, M., Deblois, C., Dassylva, N., 2008. Pesticides measured in air and precipitation in the Yamaska Basin (Quebec): Occurrence and concentrations in 2004. *Sci. Total Environ*. 394, 338–348.
- Báez, M.E., Fuentes, E., Espina, M.J., Espinoza, J., 2014. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: a critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. *J. Sep. Sci*. 37, 3125–32.
- Bancoldex, 2014a. Acuerdo Comercial - Colombia Unión Europea. http://www.eeas.europa.eu/delegations/colombia/documents/page_content/colombia_union_europea_acuerdo_comercial_jul_11.pdf.
- Bancoldex, 2014b. Boletín estadístico N°24. Precios de fertilizantes y plaguicidas. [http://www.agricultura/Boletin_Estadístico_No_24_Insumos_2014 \(2\). Pdf](http://www.agricultura/Boletin_Estadístico_No_24_Insumos_2014_(2).Pdf)
- Banerjee, K., Oulkar, D.P., Patil, S.B., Jadhav, M.R., Dasgupta, S., Patil, S.H., Bal, S., Adsule, P.G., 2009. Multiresidue determination and uncertainty analysis of 87 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 57, 4068–78.
- Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M., Sandstrom, M.W., William, A., 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. *J. Am. Water Resour. Assoc*. 80225, 323 – 332.
- Bernal, J., Ares, A.M., Pól, J., Wiedmer, S.K., 2011. Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A* 1218, 7438–7452.
- Bernal, J., Martin, M.T., Soto, M.E., Nozal, M.J., Marotti, I., Dinelli, G., Bernal, J.L., 2012. Development and application of a liquid chromatography-mass spectrometry method to

evaluate the glyphosate and aminomethylphosphonic acid dissipation in maize plants after foliar treatment. *J. Agric. Food Chem.* 4017–4025.

Bhaskara B.L., N.P., 2006. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples,. *Helv. Chim. Acta*, 89, 2686–2.

Bijlsma, L., Sancho, J. V., Pitarch, E., Ibáñez, M., Hernández, F., 2009. Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *J. Chromatogr. A* 1216, 3078–3089.

Bijlsma, L., Sancho, J. V., Hernández, F., Niessen, W.M. A., 2011. Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MS^E accurate-mass spectra. *J. Mass Spectrom.* 46, 865–875.

Bijlsma, L., Beltrán, E., Boix, C., Sancho, J. V., Hernández, F., 2014. Improvements in analytical methodology for the determination of frequently consumed illicit drugs in urban wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4261–4272.

Bogdal, C., Scheringer, M., Abad, E., Abalos, M., Van Bavel, B., Hagberg, J., Fiedler, H., 2013. Worldwide distribution of persistent organic pollutants in air, including results of air monitoring by passive air sampling in five continents. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 46, 150–161.

Boix, C., 2014. Investigación de fármacos y drogas de abuso en el ambito de la salud pública. Tesis Doctoral. Departamento de Química Fisica y Analítica. Universitat Jaume I.

Borjesson, E., Torstensson, L., 2000. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil. *J. Chromatogr. A* 886, 207–216.

- Botitsi, H. V, Garbis, S.D., Economou, A., Tsiipi, D.F., 2011. Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. *Mass. Spectrom. Rev.* 30, 907–939.
- Bozzo de Brum, M.A., 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis Maestria. Departamento de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay.
- Bruzzoniti, M.C., Checchini, L., De Carlo, R.M., Orlandini, S., Rivoira, L., Del Bubba, M., 2014. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4089–4116.
- Bustos, M., 2012. Destino ambiental del glifosato en una zona arrocería del Tolima , Colombia. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.
- Buszewski, B., Noga, S., 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 231–247.
- Caldas, S.S., Bolzan, C.M., Cerqueira, M.B., Tomasini, D., Furlong, E.B., Fagundes, C., Primel, E.G., 2011. Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11918–11926.
- Capobianco, H., Cardeal, Z., 2005. A Solid-Phase Microextraction Method for the Chromatographic Determination of Organophosphorus Pesticides in Fish, Water, Potatoes, Guava and Coffee. *J. Braz. Chem. Soc* 16, 907–914.
- Cappiello, A., Famiglioni, G., Palma, P., Trufelli, H., 2010. Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33, 1067–1081.
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., Bagnati, R., 2006. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78, 8421–8429.

- Castiglioni, S., Zuccato, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., Bagnati, R., 2008. Mass spectrometry analysis of illicit drugs in wastewater and surface water. *Mass Spectrom. Rev.* 27, 378–394.
- Castiglioni, S., Bijlsma, L., Covaci, A., Emke, E., Hernández, F., Reid, M., Ort, C., Thomas, K. V., Van Nuijs, A.L.N., De Voogt, P., Zuccato, E., 2013. Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1452–1460.
- Castiglioni, S., Thomas, K. V., Kasprzyk-Hordern, B., Vandam, L., Griffiths, P., 2014. Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Sci. Total Environ.* 487, 613–620.
- Castiglioni, S., Bijlsma, L., Covaci, A., Emke, E., Harman, C., Hernández, F., Kasprzyk-Hordern, B., Ort, C., van Nuijs, A., de Voogt P., Zuccato, E. 2015. Estimating community drug use through wastewater analysis. *EMCDDA Insights*, Chapter 2, In press.
- CEN, 2008. UNE-EN 15662 Foods of plant origin. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS - method.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A. M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Res.* 37, 1055–1063.
- Cervera, M.I., Medina, C., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J., Serrahima, E., Pineda, L., Muñoz, G., Centrich, F., Hernández, F., 2010. Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2873–2891.
- Cervera, M.I., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J., Hernández, F., 2012. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1244, 168–77.

- Cervera, M.I., Portolés, T., López, F.J., Beltrán, J., Hernandez, F., 2014. Screening and quantification of pesticide residues in fruits and vegetables making use of gas chromatography quadrupole time of flight tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 6843–6855.
- Cesafe, 2013. Comercio Argentino en: <http://www.casafe.org/> Acceso 4 Septiembre 2015.
- Chai, T., Jia, Q., Yang, S., Qiu, J., 2014. Simultaneous stereoselective detection of chiral fungicides in soil by LC-MS/MS with fast sample preparation. *J. Sep. Sci.* 37, 595–601.
- Chen, M.-X., Cao, Z.-Y., Jiang, Y., Zhu, Z.-W. 2013. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1272, 90–99.
- Chen, C., Kostakis, C., Gerber, J.P., Tschärke, B.J., Irvine, R.J., White, J.M., 2014. Towards finding a population biomarker for wastewater epidemiology studies. *Sci. Total Environ.* 487, 621–628.
- Cheng, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Meng, W., Liu, N., Chen, Z., Tao, Y., Zheng, Y., 2014. Simultaneous determination of fipronil and its major metabolites in corn and soil by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 6, 1788 – 1795.
- Cherta, L., Portolés, T., Beltrán, J., Pitarch, E., Mol, J.G.J., Hernández, F. 2013. Application of gas chromatography (triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 1314, 224-240.
- Chung, S.W.C., Chan, B.T.P., 2010. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98

organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. *J. Chromatogr. A* 1217, 4815–4824.

Ciscato, C.H.P., Bertoni Gebara, A., Henrique Monteiro, S., 2009. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006-2007. *Food Addit. Contam. Part B*, 2, 140–145.

Colin, R., Le Fur, E., Charret ur, C., Dufau, C., P ron, J.-J., 2000. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl) phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence detection. Part II: Direct determination using pre-column derivatization with NBD- Cl. *Analisis* 28, 819–824.

Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., Gregoire, C., 2012. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Manag. Sci.* 68, 16–30.

Cowell, J.E., Kunstman, J.L., J., N.P., Steinmetz, J.R., Wilson, G.R., 1986. Validation of an Analytical Residue Method for Analysis of Glyphosate and Metabolite: An Interlaboratory Study. *Food Chem.* 955–960.

Crnogorac, G., Schmauder, S., Schwack, W., 2008. Trace analysis of dithiocarbamate fungicide residues on fruits and vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 2539–2546.

Daughton, C.G., 2001. Emerging Pollutants, and Communicating the Science of Environmental Chemistry and Mass Spectrometry: Pharmaceuticals in the Environment. *American Society for Mass Spectrometry.* 12, 1067–1076.

Daughton, C.G., 2012. Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage. *Sci. Total Environ.* 414, 6–21.

De Carlo, R.M., Rivoira, L., Ciofi, L., Ancillotti, C., Checchini, L., Del Bubba, M., Bruzzoniti, M.C., 2014. Evaluation of different QuEChERS procedures for the recovery of selected drugs

and herbicides from soil using LC coupled with UV and pulsed amperometry for their detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1217–1229.

Decisión/657/2002/EC. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 8–36.

Directive 91/414/EEC, 2005. Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, 1–3.

Directive 105/2008/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.

Directive 83/1998/EC of the European Parliament and of the Council of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.

Dorea, H.S., Lanc, F.M., 1999. Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticides in Cashew Nut and Passion Fruit. *J. Microcolumn Sep.* 11, 367–375.

Druart, C., Delhomme, O., de Vaufleury, A., Ntcho, E., Millet, M., 2011. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 1725–1732.

Duran, M., Diaz, G., Franco, A., 2005. Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta* 65, 7–14.

Estudios Económicos Sectoriales (Econ) 2013. Superintendencia de Industria y Comercio. Estudios sobre plaguicidas en Colombia. Diciembre de 2007, boletín informativo N° 7, pdf.

-
- Elika, 2011. Residuos de pesticidas en alimentos. <http://www.elika.net/consumidor/es>. Acceso 25 Agosto 2014.
- EMCDDA, 2014. European Drug Report 2014: Trends and developments. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction pdf.
- EMCDDA, 2015. Perspectives on drugs: Wastewater analysis and drugs: a European multi-city study. <http://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/waste-water-analysis>, pdf.
- Enviromental Protection Agency (EPA), U.S. 2014. Pesticides. www.epa.gov. Acceso 15 Enero 2015.
- España Amortegui, J.C., 2013. Análisis de residuos de plaguicidas en frutas colombianas de exportación y cereales. Tesis de Maestría. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- España Amortegui, J.C., Guerrero Dallos, J., 2014. Comparison of QuEChERS official methodologies for the analysis of pesticide residues on Colombian fruit by GC-MS. *Food Addit. Contam. Part A*. 31, 676–687.
- Europa, Comercialización de los productos fitosanitarios (hasta junio de 2011), 2015. Sintesis de la legislación de la UE. http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant._health_checks. Acceso 20 Enero 2015.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2009. Modification of the residue definition of glyphosate in genetically modified maize grain and soybeans, and in products of animal origin on request from the European Commission. *EFSA J.* 7, 42.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2013. Reasoned opinion on the import tolerance for glyphosate in genetically modified oilseed rape. European Food Safety Authority. pdf.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2015. MRLs. <http://www.efsa.europa.eu/>. Acceso 10 Marzo 2015.

- European Union Decision, 2005. Regulation (EC) N° 396/2005 of The European Parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- Fabregat-Cabello, N., 2015. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de contaminantes basada en el cálculo de deconvolución de perfiles isotópicos. Tesis Doctoral. Departamento de Química Física y Analítica. Universitat Jaume I.
- Fabregat-Cabello, N., Sancho, J.V., Vidal, A.,González, F.,Roig-Navarro, A.F., 2014. Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution. *J. Chromatogr. A* 1328,43–51.
- FAO, 2003. Document BA/TF03/15. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental group of bananas and tropical fruits. pdf.
- FAO, 2005. Glyphosate and metabolites. http://www.fao.org/templates/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation11/Glyphosate.pdf.
- FAO, 2010. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. <http://www.fao.org/>. pdf.
- FAO, 2014. Comisión del Codex Alimentarius – Ginebra, del 14 al 18 de julio de 2014. <http://www.fao.org/news>. Acceso 30 Abril 2014.
- Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C.M., Flores, P., 2009. Multiresidue analysis of pesticides in soil by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 92, 1566–1575.
- Fenoll, J., Garrido, I., Hellin, P., Flores, P., Vela, N., Navarro, S., 2014. Use of different organic wastes in reducing the potential leaching of propanil, isoxaben, cadusafos and pencycuron through the soil. *J Env. Sci Health B* 49, 601–608.
- Freitas, S.D.S., Lanças, F.M., 2009. Matrix effects observed during pesticides residue analysis in fruits by GC. *J. Sep. Sci.* 32, 3698–3705.

- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., Séralini, G.E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262, 184–191.
- Gebara, A.B., Ciscato, C., Ferreira, M., Monteiro, S., 2005. Pesticide residues in vegetables and fruits monitored in São Paulo city, Brazil, 1994-2001. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 163–9.
- Generalitat Valenciana, 2014. Boletín de Información Agraria. <http://www.agricultura.gva.es>. Acceso 27 Febrero 2015.
- Gimsing, A.L.; Borggaard, O.K. & Bang, M. 2004. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *Eur. J. Soil Sci.*, 55, 183–191.
- Ghanem, A., Bados, P., Kerhoas, L., Dubroca, J., Einhorn, J., 2007a. Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOc derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. *Anal. Chem.* 79, 3794–3801.
- Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A., de Alencastro, L., Taibi, S., Einhorn, J., Mougin, C., 2007b. Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69, 1368–73.
- Glass, R.L., Model, S., Environmental, A., Agricultural, B., 1983. Liquid Chromatographic Determination of Glyphosate in Fortified Soil and Water Samples. *J. Agric. Food Chem* 280–282.
- Glass, R.L., 1987. Glyphosate by Soils and Clay Minerals. *J. Agric. Food Chem* 497–500.
- Gomez de Enciso, C., 2009. Mecanismo de resistencia de *Parthenium hysterophorus* L. a glifosato, Valle del Cauca, Colombia. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
- Gonzalez-Martinez, M., Brun, E., Puchades, R., Maquiera, A., Ramsey, K., Rubio, F., 2005. Glyphosate Immunosensor . Application for Water. *Anal. Chem.* 77, 4219–4227.

- Goodwin, L., Startin, J.R., Goodall, D.M., Keely, B.J., 2004. Negative ion electrospray mass spectrometry of aminomethylphosphonic acid and glyphosate: elucidation of fragmentation mechanisms by multistage mass spectrometry incorporating in-source deuterium labelling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 37–43.
- Goscinnny, S., Unterluggauer, H., Aldrian, J., Hanot, V., Masselter, S., 2012. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". *Food Anal. Methods* 5, 1177–1185.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C., 2010. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3929–3937.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Hernández, F., 2011. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 2264–2275.
- Gracia-Lor, E., 2013. Potencial de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem para la detección, cuantificación y confirmación de farmacos en aguas. Tesis Doctoral. Departamento de Química Física y Analítica. Universitat Jaume I.
- Granby, K, and Vahl, M., 2001. Investigation of the herbicide glyphosate and the plant growth regulators chlormequat and mepiquat in cereals produced in Denmark. *Food Addit. Contam.*, 37–41.
- Granby, K., Johannesen, S., Vahl, M., 2003. Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam.* 20, 692–8.
- Green, J.M., 2014. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 70, 1351–1357.
- Gregor, H.P.; Collins, F.C. and Pope, M. 1951, *J. Colloid Sci.*, 6, 304.

- Grimalt, S., 2009. Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. Tesis Doctoral. Departamento de Química Física y Analítica. Universitat Jaume I.
- Grisales, N., Merchaán, F., Sánchez, A., 2010. Fumigaciones de cultivos ilícitos con glifosato: ¿solución o catástrofe? Rev. económica Supuestos. <http://revistasupuestos.uniandes.edu.co/p=1168>. Acceso 19 Septiembre 2014.
- Guillarme, D. Schappler, J. Rudaz S. and Veuthey, J.-L. 2010. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 29, 15–27.
- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, Lamia. Guha, N., Chiara Scoccianti, Heidi. Mattock, K.S., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. Int. Agency Res. Cancer. Acceso 19 Septiembre 2014.
- Hao, C. Morse, D., Morra, F., Zhao, X. Yang, P. and Nunn, B. 2011. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column. *J. Chromatogr. A*, 1218, 5638–43.
- Hadbook, 2004. Herbicide persistence and how to test for residue in soils. Univ. Illinois 343–350.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.* 48, 89-93.
- Hanke, I., Singer, H., Hollender, J., 2008. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2265–2276.

- Hart, M.R., Brookes, P.C., 1997. Soil microbial biomass and mineralisation of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biol. Biochem.* 28, 1641-1649.
- Hasegawa, K., Wurita, A., Minakata, K., Gonmori, K., Nozawa, H., Yamagishi, I., Watanabe, K., Suzuki, O., 2015. Postmortem distribution of flunitrazepam and its metabolite 7-aminoflunitrazepam in body fluids and solid tissues in an autopsy case: Usefulness of bile for their detection. *Leg. Med.* In press.
- Hemström, P., Irgum, K., 2006. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 12, 1784 – 821.
- Hernández, F., Hidalgo, C., Sancho, J.V., 2000. Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled column liquid chromatography with fluorescence detection. *JAOAC.* 72, 2313-2322.
- Hernández, F., Marín, J.M., Pozo, Ó.J., Sancho, J. V., López, F.J., Morell, I., 2008. Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88, 409–424.
- Hernández, F., Ibañez, M., Portolés, T., 2012. “Pesticide residue analysis in environmental samples by hyphenated chromatography/mass spectrometry,” in. *Comprehensive Environmental Mass Spectrometry*. pp. 309 – 328, Publications, A.L.I. (Ed.).
- Hernández, F., Cervera, M.I., Portolés, T., Beltrán, J., Pitarch, E., 2013. The role of GC-MS/MS with triple quadrupole in pesticide residue analysis in food and the environment. *Anal. Methods* 5, 5875-5894.
- Herrera, M., 2011. Implementación de una metodología para la determinación de glifosato en muestras de agua. Tesis Maestría. Departamento de Química. Universidad Industrial de Santander.
- Hidalgo, C., Rios, C., Hidalgo, M., Salvadó, V., Sancho, J. V, Hernández, F., 2004. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate

and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1035, 153–157.

Hjorth, K., Johansen, K., Holen, B., Andersson, A., Christensen, H.B., Siivinen, K., Toome, M., 2011. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America – A Nordic project. *Food Control* 22, 1701–1706.

Hogendoorn, E. A., Ossendrijver, F.M., Dijkman, E., Baumann, R. A., 1999. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 833, 67–73.

Homazava, N., Gachet Aquillon, C., Vermeirssen, E., Werner, I., 2014. Simultaneous multi-residue pesticide analysis in soil samples with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using QuEChERS and pressurised liquid extraction methods. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 94, 1085–1099.

Hornsby, A.G; Wauchope, R.D; Herner, A.E. 1996. Pesticide properties in the environmental. Springer-Verlag, New York.

Ibáñez, M., Pozo, Ó.J., Sancho, J. V., López, F.J., Hernández, F., 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1081, 145–155.

Ibáñez, M., Pozo, O.J., Sancho, J. V, López, F.J., Hernández, F., 2006. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1134, 51–55.

Ibáñez, M., 2007. Potencial de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo para la elucidación, cuantificación y confirmación de plaguicidas y productos de transformación en muestras ambientales. Tesis Doctoral. Departamento de Química Física y Analítica. Universitat Jaume I.

- ICA, 2010. Mayor oportunidad para la uchuva en el mercado de la UE [WWW Document]. URL <http://www.ica.gov.co/noticias/agricola/2010/mayor-oportunidad-para-la-uchuva-en-el-mercado-de-.aspx>. Acceso 20 Octubre 2014.
- ICA, 2012. Plaguicidas Químicos. Insumos Agrícolas Químicos producción en Colombia. <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos.aspx>. Acceso 20 Octubre 2014.
- Infodrogas, 2014. La ketamina. <http://infodrogas.org/inf-drogas/la-ketamina>. Acceso 1 Marzo 2015.
- Islas, 2013. Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna. Tesis Maestría. Departamento de Química. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Mexico.
- Islas, G., Rodríguez, J. a., Mendoza-Huizar, L.H., Pérez-Moreno, F., Carrillo, E.G., 2014. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Soils By Hplc With Pre-Column Derivatization Using 1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonate. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37, 1298–1309.
- Ismail, B.S., Kadir, Z.A., Jusoh, K., Mat, N., 2002. Adsorption-desorption, mobility and degradation of ¹⁴C-glyphosate in two soil series. *J. Sains Nukl. Malaysia* 20, 17–29.
- Ivdrá, N., Herrero-Martín, S., Fischer, A., 2014. Validation of user- and environmentally friendly extraction and clean-up methods for compound-specific stable carbon isotope analysis of organochlorine pesticides and their metabolites in soils. *J. Chromatogr. A* 1355, 36–45.
- Jardim, A.N.O., Mello, D.C., Goes, F.C.S., Frota Junior, E.F., Caldas, E.D., 2014. Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC-μECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. *Food Chem.* 164, 195–204.

- Kailasa, S.K., Wu, H.F., Huang, S.D., 2013. Recent developments on mass spectrometry for the analysis of pesticides in wastewater. Chapter 5. Pag. 99-119. In Pesticides - Strategies for pesticides analysis. Ed. Stoycheva, Intech.web.org.
- Kasprzyk-Hordern, B., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., de Voogt, P., Emke, E., Hernández, F., Ort, C., Reid, M., van Nuijs, A.L.N., Thomas, K. V., 2014. Wastewater Profiling for monitoring drug use and assessing community health; assessing community health. Environmentmagazine.co.uk, pag. 144-151, pdf.
- Khorshid, M., Souaya, E.R., Hamzawy, A.H., Mohammed, M.N., 2015. QuEChERS Method Followed by Solid Phase Extraction Method for Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish. *Hindawi* 2015, 1-7.
- Khrolenko, M., Wieczorek, P., 2005. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride (TsCl). *J. Chromatogr. A* 1093, 1093, 111.
- Kittlaus, S., Kempe, G., Speer, K., 2013. Evaluation of matrix effects in different multipesticide residue analysis methods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, including an automated two-dimensional cleanup approach. *J. Sep. Sci.* 36, 2185-95.
- Kmellár, B., Abrankó, L., Fodor, P., Lehotay, S.J., 2010. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam. Part A* 27, 1415-1430.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E. a, Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer, S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Sci. Total Environ.* 354, 191-7.

- Kovaříková, P., Stariat, J., Klimeš, J., Hrušková, K., Vávrová, K., 2011. Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites-The cardioprotectant dexrazoxane as a model case. *J. Chromatogr. A* 1218, 416–26.
- Kruve, A., Künnapas, A., Herodes, K., Leito, I., 2008. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1187, 58–66.
- Kruve, A., Auling, R., Herodes, K., Leito, I., 2011. Study of liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry matrix effect on the example of glyphosate analysis from cereals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 3252–8.
- Kumar, M.A., Blasco, C., Picó, Y., 2010. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J. Chromatogr. A* 1217, 4018–40.
- Kwon, H., Lehotay, S.J., Geis-Asteggianti, L., 2012. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *J. Chromatogr. A* 1270, 235–45.
- Lämmerhofer, M., Richter, M., Wu, J., Nogueira, R., Bicker, W., Lindner, W., 2008. Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. *J. Sep. Sci.* 31, 2572–88.
- La Republica, 2012. Frutas exóticas conquistan el exterior [WWW Document]. URL <http://www.larepublica.co/agronegocios/frutas-exoticas-conquistan-el-exterior>. Acceso 3 Octubre 2014
- Lamoureux, C., Foglia, G., Le Rouzo, G., 2011. How to separate ionic liquids: Use of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and mixed mode phases. *J. Chromatogr. A* 1218, 3022–3028.

- Landry, D., Dousset, S., Fournier, J.-C., Andreux, F., 2005. Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-Romanée, 21-France). *Environ. Pollut.* 138, 191–200.
- Lee, E.A., Zimmerman, L.R., Bhullar, B.S., Thurman, E.M., Usgs, U.S.G.S., Place, Q.C., Group, O., 2002. Linker-Assisted Immunoassay and Liquid Chromatography / Mass Spectrometry for the Analysis of Glyphosate. *Anal. Chem.* 74, 5031–5037.
- Lee, J.-M., Park, J.-W., Jang, G.-C., Hwang, K.-J., 2008. Comparative study of pesticide multi-residue extraction in tobacco for gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1187, 25–33.
- Legiscomex, 2013. Exportación de frutas exóticas colombianas. www.legiscomex.com/bancomedios/documentos/estudio_frutas_tropicales_Colombia.pdf.
- Lehotay, S.J., de Kok, A., Hiemstra, M., Van Bodegraven, P., 2005a. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 88, 595–614.
- Lehotay, S.J., Mastovská, K., Yun, S.J., 2005b. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.* 88, 630–638.
- Lehotay, S.J., 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* 90, 485–520.
- Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N., 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1217, 2548–2560.
- Leiva, P., Picapietra, G., 2012. Compatibilidad para mezclas de tanque de tres herbicidas utilizados en barbecho químico. INTA. EEA 1–11.

- Lenin, G.S., 2010. Análisis sobre el impacto ambiental del uso de glifosato y sus mezclas (coadyubantes) derivadas de las actividades productivas (agrícolas) en Colombia, alternativas de producción mediante la optimización (BPA) y el desarrollo sostenible. Tesis Maestria. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M., 2008. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* 75, 284–293.
- Li, X., Xu, J., Jiang, Y., Chen, L., Xu, Y., Pan, C., 2009. Hydrophilic-interaction liquid chromatography (HILIC) with dad and mass spectroscopic detection for direct analysis of glyphosate and glufosinate residues and for product quality control. *Acta Chromatogr.* 21, 559–576.
- Liang, H. C. Bilon, N., Hay, M. T., 2013. Analytical Methods for Pesticide Residues. *Water Environ. Res.* 85, 2117-2138.
- Lundgren, L.N., 1986. A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 34, 535–538.
- Mallat, E., Barcelo, D., 1998. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid- phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 823, 129–136.
- Mantzos, N., Karakitsou, A., Zioris, I., Leneti, E., Konstantinou, I., 2013. QuEChERS and solid phase extraction methods for the determination of energy crop pesticides in soil, plant and runoff water matrices. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93, 1566 – 1584.
- Martins-junior, H. A, Lebre, D. T. Wang, A. Y., Pires, M. A. F and Bustillos, O. V., 2009. An alternative and fast method for determination of glyphosate and

aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 23, 1029–1034.

Marek, L.J., Koskinen, W.C., 2013. Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Pest Manag. Sci.* 70, 1158 – 1164.

Marín, J.M., Gracia-Lor, E., Sancho, J. V, López, F.J., Hernández, F., 2009. Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects. *J. Chromatogr. A* 1216, 1410–1420.

Marín, 2010. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en aguas y vegetales mediante LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. Tesis Doctoral. Departament de Química Física y Analítica. Universitat Jaume I.

Masiá, A., Vázquez, K., Campo, J., Picó, Y., 2015. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Turia River Basin. *J. Chromatogr. A* 1378, 19–31.

Massaro, A., 2010. Criterios para la aplicación de herbicidas en barbechos químicos. INTA. EEA 61–68.

Miles, C., Moye, A., 1988. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 36, 486–491.

Minagricultura, 2014. Insumos Agrícolas. <http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura>. Acceso 4 Junio 2015.

Ministerio de Salud y Protección Social, 2012. Documento plan de acción para el fortalecimiento del sistema nacional de inocuidad de los alimentos. Ministerio de Salud y Protección Social. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO), Proyecto UTF/COL/039. Bogotá.

- Mol, H.G.J., Plaza-bolan, P., Zomer, P., Rijk, T.C. De, Stolker, A.A.M., 2008. Towards a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides , Mycotoxins , Plant Toxins , and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Anal. Chem.* 80, 9450–9459.
- Mol, H.G.J., Zomer, P., de Koning, M., 2012. Qualitative aspects and validation of a screening method for pesticides in vegetables and fruits based on liquid chromatography coupled to full scan high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2891–908.
- Mol, H. G. J., van Dam, R. C. J. 2014. Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, 6817–25.
- Moye, H.A., Boning, A.J., 1979. A Versatile Fluorogenic Labelling Reagent for Primary and Secondary Amines: 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. *Anal. Lett.* 25–35.
- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Portolés, T., Berntssen, M.H.G., Pérez-Sánchez, J., Hernández, F., 2014. Screening of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds and fish tissues by gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2165–2174.
- Nagatomi, Y., Yoshioka, T., Yanagisawa, M., Uyama, A. and Mochizuki, N. 2013. Simultaneous LC-MS/MS Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolic Products in Beer, Barley Tea, and Their Ingredients. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 2218–2221.
- National Institute on Drugs Abuse, 2013. Ketamina <http://las-drogas.net/ketamina>. Acceso 5 Septiembre 2015.
- Navickiene, S., Ribeiro, M.L., 2005. An Alternative LC-UV Procedure for the Determination of Prochloraz Residues in Fruits. *J. Braz. Chem. Soc* 16, 157–162.
- Navickiene, S., Aquino, A., Bezerra, D.S.S., 2010. A matrix solid-phase dispersion method for the extraction of seven pesticides from mango and papaya. *J. Chromatogr. Sci.* 48, 750–754.

- Nedelkoska, T., Low, G.-C., 2004. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Chim. Acta* 511, 145–153.
- Net, S., Delmont, A., Sempéré, R., Paluselli, A., Ouddane, B., 2015. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Sci. Total Environ.* 515-516, 162–180.
- Niessen, W.M.A., Manini, P., Andreoli, R., 2006. Matrix effect in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography - mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 881–899.
- Nimer, M., Ballesteros, O., Navalón, A., Crovetto, G., Verge, C., López, I., Berna, J.L., Vílchez, J.L., 2007. New sample treatment for determination of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in agricultural soils by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 2175–2184.
- Nivia, E., 2001. Conferencia “Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos si son peligrosas. Algunas aproximaciones”. Rapalmira – Colombia. Red de Acción en Plaguicidas y Alternativas. Pag. 1–21. En “Las Guerras en Colombia: Drogas, Armas y Petróleo” “The Wars in Colombia: Drugs, Guns and Oil” Instituto Hemisférico de las Américas. Universidad de California, Davis, Mayo 17-19, 2001.
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C.P.B., Lucci, P., 2012. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J. Chromatogr. A* 1228, 298–323.
- Obelisc, 2012. Separation, Liquid Technology. Cell. LC Columns with Liquid Separation Cell Technology. In Cataloge SIELC pdf.
- O’Mahony, J, L. Clarke, M. Whelan, R. O’Kennedy, S. J. Lehotay and M. Danaher, 2013. The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food - challenges and applications. *J. Chromatogr. A*, 1292, 83–95.

- Omar, M.M.A., Elbashir, A.A., Schmitz, O.J., 2015. Determination of acrylamide in Sudanese food by high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 176, 342–349.
- Ort, C., Lawrence, M.G., Rieckermann, J., Joss, A., 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: Are your conclusions valid? A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6024–6035.
- Ort, C., van Nuijs, A.L.N., Berset, J.D., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., de Voogt, P., Emke, E., Fatta-Kassinos, D., Griffiths, P., Hernández, F., González-Mariño, I., Grabic, R., Kasprzyk-Hordern, B., Mastroianni, N., Meierjohann, A., Nefau, T., Östman, M., Pico, Y., Racamonde, I., Reid, M., Slobodnik, J., Terzic, S., Thomaidis, N., Thomas, K. V., 2014. Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis. *Addiction* 109, 1338–1352.
- Osan, 2012. Perfil nacional de consumo de frutas y verduras. Observatorio de Seguridad Alimentaria y Nutricional de Colombia. http://www.osancolombia.gov.co/doc/perfil_nacional_Consumo_Colombia_2012. Pdf.
- Patsias, J., Papadopoulou, A., Papadopoulou- Mourkidou, E., 2001. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. *J. Chromatogr., A* 932, 83–90.
- Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A., 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1697–714.
- Peruzzo, P.J., Porta, A. A, Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–6.

- Piccolo, A., Celano, G., Aienzo, M., Mirabella, A., 1994. Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *J. Environ. Sci Health*. 29, 1105-1115.
- Piccolo, A., Celano, G., Conte, P., 1996. Adsorption of Glyphosate by Humic Substances. *J Agri . Food Chem* 44, 2442-2446.
- Picó, Y., Vale, D. 2006. Control of pesticide residues by liquid chromatography - mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 917-960.
- Picó, Y., Barceló, D. 2008. The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 27, 821-835.
- Pihlström, T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U., Osterdahl, B.-G., 2007. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1773-89.
- Pinto, C.G., Laespada, M.E.F., Martín, S.H., Ferreira, A.M.C., Pavón, J.L.P., Cordero, B.M., 2010. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta* 81, 385-91.
- Pispini, M., Schimpf, M., López, J., Chandrasekaran, K., 2014. Amigos de la tierra Internacional: [WWW Document]. “¿Quién se beneficia con los cultivos transgénicos?” URL <http://www.foeeurope.org/sites/default/files/publications>. Acceso 25 Marzo 2014.
- Portolés, T., Sancho, J.V., Hernández, F., Newton, A., Hancock, P., 2010. Potential of atmospheric pressure chemical ionization source in GC-QTOF MS for pesticide residue analysis. *J. Mass Spectrom.* 45, 926-936.
- Portolés, T., Pitarch, E., López, F.J., Hernández, F., 2011. Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 303-315.

- Portolés, T., Mol, J.G.J., Sancho, J. V., Hernández, F., 2012. Advantages of atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography tandem mass spectrometry: pyrethroid insecticides as a case study. *Anal. Chem.* 84, 9802-9810.
- Portolés, T., Mol, J.G.J., Sancho, J. V., Hernández, F., 2014. Use of electron ionization and atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for screening and identification of organic pollutants in waters. *J. Chromatogr. A* 1339, 145-153.
- Postigo, C., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D., 2008. Analysis of drugs of abuse and their human metabolites in water by LC-MS2: A non-intrusive tool for drug abuse estimation at the community level. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27, 1053-1069.
- Prata, F., Lavorenti, A., Regitano, J.B., Vereecken, H., Tornisielo, V.L., Pelissari, A., 2005. Glyphosate behavior in a Rhodic Oxisol under no-till and conventional agricultural systems. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 29, 61-69.
- Proexport, 2013. Frutas frescas. http://www.proexport.com.co/cartilla_2/agroindustria.pdf.
- Qian, K., Tang, T., Shi, T., Wang, F., Li, J., Cao, Y., 2009. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal. Chim. Acta* 635, 222-226.
- Raina-Fulton, R. 2014. A Review of Methods for the Analysis of Orphan and Difficult Pesticides: Glyphosate, Glufosinate, Quaternary Ammonium and Phenoxy Acid Herbicides, and Dithiocarbamate and Phthalimide Fungicides. *J. AOAC Int.*, 97, 965-977.
- Ramírez Restrepo, A., Gallo Ortiz, A.F., Hoyos Ossa, D.E., Peñuela Mesa, G.A., 2014. QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. *Food Chem.* 158, 153-161.

- Reddy, K., Rimando, A., Duke, S., 2004. Aminomethylphosphonic Acid , a Metabolite of Glyphosate , Causes Injury in Glyphosate-Treated , Glyphosate-Resistant Soybean. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5139 – 5143.
- Reid, M., Langford, K., Mørland, J., Thomas, K., 2011. Analysis and interpretation of specific ethanol metabolites, ethyl sulfate, and ethyl glucuronide in sewage effluent for the quantitative measurement of regional alcohol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 35, 1593–1599.
- Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- Regulation (EC) No 293/2013 of 20 March 2013 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for emamectin benzoate, etofenprox, etoxazole, flutriafol, glyphosate, phosmet, pyraclostrobin, spinosad and spirotetramat in or on certain products.
- Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M., 2010. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A* 1217, 2342–2357.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G., 2005. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. *Environ. Health Perspectives* 113, 716 –720.
- Riley, P., Cotter, J., Contiero, M., Watts, M., 2011. Tolerancia a herbicidas y cultivos transgénicos. Por qué el mundo debería estar preparado para abandonar el glifosato. En: Greenpeace International. Buenos Aires, Argentina. pdf.
- Romano, R.M., Romano, M. A., Bernardi, M.M., Furtado, P. V., Oliveira, C. A., 2010. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch. Toxicol.* 84, 309–317.

- Romano, M.A., Wisniewski, P., Viau, P., Romano, R.M., Campos, D.A., Bernardi, M.M., Santos, L.D., De Souza, P.B., Nunes, M.T., De Oliveira, C.A., 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch. Toxicol.* 86, 663–673.
- Roseboom, H., Berkhoff, C.J., 1982. Determination of the herbicide glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after fluorescence labelling. *Anal. Chim. Acta* 135, 373–377.
- Rueppel, M.L., Suba, L.A., Marvel, J.T., 1976. Derivatization of Aminoalkylphosphonic acid for Characterization by Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 3, 28–31.
- SANCO/825/00 rev. 8.1, 2010. European Commission (EC), Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods.
- SANCO/10684/2009. European Commission (EC), Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance Document on Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.
- SANCO/12571/2013. European Commission (EC), Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance Document on Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.
- Sancho, J. V, Hernández, F., Lopez, F.J., Hogendoorn, E.A., Dijkman, E., Zoonen, P. Van, 1996a. Rapid determination of glufosinate , glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *J Chromatogr. A* 737, 75–83.
- Sancho, J.V., Hidalgo, C., Hernández, F., López, F.J., 1996b. Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62, 53–63.

- Savant, R.H., Banerjee, K., Utture, S.C., Patil, S.H., Dasgupta, S., Ghaste, M.S., Adsule, P.G., 2010. Multiresidue analysis of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1447–54.
- Sichilongo, K., Chinyama, M., Massele, A., Vento, S., 2014. Comparative chromatography-mass spectrometry studies on the antiretroviral drug nevirapine-Analytical performance characteristics in human plasma determination. *J. Chromatogr. B.* 945-946, 101–109.
- Solange, M., 2011. Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. Tesis Doctoral. Departamento Ciencias. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Soler, C., Mañes, J., Picó, Y., 2008. The Role of the Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Pesticide Residue Determination in Food. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 38, 93–117.
- Specht, 1992. Manual of pesticide residue analysis, DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft, Pesticides Commission. VCH, Weinheim, 317-322.
- Stalikas, C.D., Konidari, C.N., 2001. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A* 907, 1–19.
- Statista, 2015. Total value of global agrochemical market from 2006 to 2013 (in million U.S. dollars)* at <http://www.statista.com/statistics/311943/agrochemical-market-value-worldwide/>. Acceso 30 Abril 2015.
- Stoytcheva, M., Zlatev, R., Velkova, Z., Valdez, B., 2011. Organophosphorus Pesticides Determination by Electrochemical Biosensors. Chapter 15. Pag. 359-362. In Pesticides - Strategies for pesticides analysis. Ed. Stoycheva, Intech.web.org.
- Struger, J.; Thompson, D.; Staznik, B.; Martin, P.; McDaniel, T., Marvin, C., 2008. Occurrence of glyphosate in surface waters of Southern Ontario. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 378–384.

- Sun, Y., Wang, C., Wen, Q., Wang, G., Wang, G., Wang, H., Qu, Q., 2010. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Water by LC Using a New Labeling Reagent, 4-Methoxybenzenesulfonyl Fluoride. *Chromatographia* 72, 679–686.
- Sundravadana, S., Alice, D., Samiyappan, R., Kuttalam, S., 2008. Determination of Azoxystrobin Residue by UV Detection High Performance Liquid Chromatography in Mango. *J. Braz. Chem. Soc* 19, 60–63.
- Syan, H.S., Prasher, S.O., Pageau, D., Singh, J., 2014. Dissipation and persistence of major herbicides applied in transgenic and non-transgenic canola production in Quebec. *Eur. J. Soil Biol.* 63, 21–27.
- Tadeo, J., Sánchez - Brunete, C., Perez, R., M.D., F., 2000. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 882, 175–191.
- Tadeo, J.L., Pérez, R.A., Alberro, B., García-Valcárcel, A.I., Sánchez-Brunete, C., 2012. Review of Sample Preparation Techniques for the Analysis of Pesticide Residues in Soil. *J. AOAC Int.* 95, 1258–1271.
- Taylor, P.J., 2005. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 38, 328–34.
- Thermo scientific, 2014. HILIC Separations. A practical guide to HILIC mechanisms, method development and troubleshooting. pdf.
- Thomas, K. V., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., Emke, E., Grabic, R., Hernández, F., Karolak, S., Kasprzyk-Hordern, B., Lindberg, R.H., Lopez de Alda, M., Meierjohann, A., Ort, C., Pico, Y., Quintana, J.B., Reid, M., Rieckermann, J., Terzic, S., van Nuijs, A.L.N., de Voogt, P., 2012. Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci. Total Environ.* 432, 432–439.
- Trufelli, H., Palma, P., Famiglioni, G., Cappiello, A., 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 30, 491–509.

- Tseng, S.-H., Lo, Y.-W., Chang, P.-C., Chou, S.-S., Chang, H.-M., 2004. Simultaneous quantification of glyphosate, glufosinate, and their major metabolites in rice and soybean sprouts by gas chromatography with pulsed flame photometric detector. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4057–63.
- Van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Covaci, A., 2011a. Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1218, 5964–5974.
- Van Nuijs, A.L.N., Castiglioni, S., Tarcomnicu, I., Postigo, C., de Alda, M.L., Neels, H., Zuccato, E., Barcelo, D., Covaci, A., 2011b. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci. Total Environ.* 409, 3564–3577.
- Van Nuijs, A.L.N., Mougel, J.F., Tarcomnicu, I., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H., Covaci, A., 2011c. Sewage epidemiology - A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environ. Int.* 37, 612–621.
- Veiga, F., Zapata, J., Fernandez Marcos, M., Alvarez, E., 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Total Environ.* 271, 135–144.
- Venhuis, B., de Voogt, P., Emke, E., Causanilles, A., Keizers, P., 2014. Success of rogue online pharmacies: sewage study of sildenafil in the Netherlands. *Brit. Med. J.* 349, 4317.
- Vereecken, H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: A review. *Pest Manag. Sci.* 1139–1151.
- Villeneuve, A., Larroudé, S. & Humbert, J.F., 2011. Herbicide Contamination of Freshwater Ecosystems: Impact on Microbial Communities. Charter 16. Pag. 285-312. In: Pesticides - Formulations, Effects, Fate. <http://www.intechopen.com/articles/show/> Ed. Margarita Stoytcheva. Intech.web.org.
- Vreeken, R., Speksnijder, P., Bobeldijk-Pastorova, I., Noij, T.H., 1998. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase

- extraction–high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 794, 187–199.
- Wang, P., Bartlett, M.G., 1998. Collision-induced dissociation mass spectra of cocaine, and its metabolites and pyrolysis products. *J. Mass Spectrom.* 33, 961–967.
- Waters, 2008. Xbridge columns. Columnas HPLC XBridge. [http://www. Waters.com](http://www.Waters.com). Acceso 25 Marzo 2015.
- Waters, 2012. BEH, AcQuity UPLC, Columns. The Science of what’s possible. Manual. [http://www. Waters.com](http://www.Waters.com). Acceso 25 Marzo 2015.
- Wcropchemicals, 2013. International Pesticide Market and Regulatory Profile at. http://wcropchemicals.com/pesticide_regulatory_profile. Acceso 30 Julio 2015.
- Weijun, Y., 2015. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography with nitrogen chemiluminescence detection. *J. Sep. Sci.* 38, 2272–2277.
- Whelan, M., O’Mahony, J., Moloney, M., Cooper, K.M., Furey, A., Kennedy, D.G., Danaher, M., 2013. Maximum residue level validation of triclabendazole marker residues in bovine liver, muscle and milk matrices by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1275, 41–47.
- Wilkowska, A., Biziuk, M., 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.* 125, 803–812.
- Williams, G., Kroes, R., Munro, C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–65.
- Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y., Ueno, Y., 2011. Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1218, 3675–80.

-
- You, J., Koropchak, J. A., 2003. Condensation nucleation light scattering detection with ion chromatography for direct determination of glyphosate and its metabolite in water. *J. Chromatogr. A* 989, 231–238.
- Zanella, R., Prestes, O.D., Friggi, A., Martins, M.L., Adaime, M.B., 2012. An Overview About Recent Advances in Sample Preparation Techniques for Pesticide Residues Analysis in Cereals and Feedstuffs. Charter 8. Pag 150-170. In Pesticides – Recent Trends in Pesticide Residue Assay. Ed. Margarita Stoytcheva. INTECH.WEB.ORG.
- Zhang, J.M., Chai, W.G., Wu, Y.L., 2012. Residues of chlorantraniliprole in rice field ecosystem. *Chemosphere* 87, 132–136.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Qu, Q., Wang, G., Wang, C., 2013. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labeling reagent. *Anal. Methods*. 5, 6465-6472.
- Zhao, B., Zhang, J., Gong, J., Zhang, H., Zhang, C., 2009. Glyphosate mobility in soils by phosphate application: Laboratory column experiments. *Geoderma* 149, 290–297.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Dalamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., Fanelli, R., 2005. Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ. Health. A Glob. Access Sci. Source* 4, 11.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2008. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ. Health Perspect.* 116, 1027–103

Sugerencias para trabajos futuros

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se pueden proponer nuevas líneas de trabajo de interés para futuras investigaciones:

- Estudiar las aplicaciones del analizador QTOF en métodos LC-QTOF MS y/o GC-QTOF MS para fines de screening y posible cuantificación de todo tipo de plaguicidas (polares y no polares; volátiles y no volátiles) en productos vegetales, con especial atención a las frutas tropicales, suelos y aguas. Estudiar las aplicaciones del analizador QTOF en la identificación de compuestos desconocidos (por ejemplo, interferentes) en matrices ambientales y/o alimentarias.
- Ampliar los estudios sobre glifosato en otros tipos de matrices ambientales y alimentarias, así como en malas hierbas que pudieran presentar resistencia a este herbicida. Ampliar el número de analitos a investigar en relación con el glifosato, incluyendo tanto el AMPA como otros metabolitos que pudieran tener relevancia en cultivos transgénicos, como N-acetil glifosato y N-acetil AMPA.
- Ampliar los estudios cuantitativos (basados en LC-MS/MS) sobre drogas de abuso en aguas residuales a otros tipos de drogas incluyendo sus metabolitos más relevantes, con énfasis en las nuevas sustancias psicoactivas (NPS) que puedan detectarse en el “mercado”, con el objetivo de poder aportar información sobre su uso en las poblaciones objeto de estudio.
- Aprovechar las excelentes prestaciones del analizador QTOF, que permite investigar la presencia de un elevadísimo número de compuestos, incluso sin disponer del patrón de referencia, para ampliar el screening de drogas y fármacos en aguas residuales y superficiales, incluyendo en la lista de analitos cientos de compuestos de interés.

Artículos científicos relacionados con la tesis

Artículos que forman parte de la Tesis Doctoral

A.M. Botero-Coy, J. M. Marín, M. Ibáñez, J. V. Sancho, F. Hernández. **Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** Anal. Bioanal. Chem. (2012) 402:2287-2300.

A.M. Botero-Coy, J. M. Marín, R. Serrano, J. V. Sancho, F. Hernández. **Exploring matrix effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits.** Anal. Bioanal. Chem. (2015), 407:3667-3681.

E. De Gerónimo, A. M. Botero-Coy, J. M. Marín, V. C. Aparicio, J. L. Costa, J. V. Sancho, F. Hernández. **Simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography - tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina.** Anal. Methods, 7 (2015), 9504-9512.

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández **Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.** J. Chromatogr. A. 1292 (2013) 132-141.

A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández. **Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean.** J. Chromatogr. A. (2013) 1313:157-165.

Otros artículos relacionados

F. Hernández, M. Ibáñez, A.M. Botero-Coy, R. Bade, M. C. Bustos-López, J. Rincón, A. Moncayo, L. Bijlsma. **LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá, Colombia.** Anal. Bioanal. Chem. (2015) 407: 6405–6416.

F. Hernández, T. Portolés, M. Ibáñez, M.C. Bustos-López, R. Díaz, A.M. Botero-Coy, C.L. Fuentes, G. Peñuela. **Use of time-of-flight mass spectrometry for large screening of organic pollutants in surface waters and soils from a rice production area in Colombia.** Sci. Total Environ. 439 (2012) 249–259.

F. Been, L. Bijlsma, L. Benaglia, J.D. Berset, A.M. Botero-Coy, S. Castiglioni, L. Kraus, F. Zobel, M. Schaub, A. Bücheli, F. Hernández, P. Esseiva, C. Ort. **Investigation of Geographical Differences in Illicit Drugs Consumption in Germany, Switzerland and Liechtenstein via Wastewater Analyses** DAD, en revision.

C. Aristizábal-Ciro, S. Luguera-González, P. Díaz-Guridi, P. González-Barrero, A. M. Botero-Coy, G. Peñuela-Mesa, F. Hernández, A. Otero-Fernández, A. Maroto-Valiente, J. A. Otero-Hermida. **Removal of pharmaceutical active compounds from drinking water using nanofiltration technology: comparative study of different membranes.** Sep. Purif. Technol. enviado

Agradecimientos

Mi agradecimiento muy sincero a los doctores Félix Hernández y Jose Manuel Marín, directores de mi tesis. Gracias por el apoyo y los conocimientos impartidos durante todo este tiempo. Sin duda, sus enseñanzas fueron claves para la realización y culminación de este proyecto, que comenzó hace ya cinco años.

Además, mis felicitaciones y reconocimiento al doctor Jose Manuel Marín por la dirección de ésta, su primera tesis doctoral. Más que director fue un amigo, siempre dispuesto a escucharme. Indudablemente, me aportó mucho, tanto a nivel profesional como personal. Gracias Jose, admiro tu personalidad, paciencia y don de gentes.

Al doctor Juan Vicente Sancho, siempre dispuesto a colaborar y ayudar, y que estuvo al tanto de la investigación presentada en esta tesis; sin duda, una “mente brillante” que no siempre es fácil seguir al ritmo que él impone, pero que en todo momento aporta muy buenas ideas y resuelve los problemas. Moltíssimes gràcies JV.

En este largo proceso de aprendizaje tuve la suerte de encontrar personas maravillosas, a las que hoy puedo considerar como “**amigos**”, palabra que, aun siendo corta, encierra muchísimo significado y supone un pilar importante en nuestras vidas. “Los amigos son la familia que se escoge”. Gracias a todos ustedes por brindarme momentos tan agradables, de risas. Gracias, Carlos Segarra, Silvia, María E, Alejandro, Víctor, Emma, Ari, Neus, Carlos Sales. Gratitud también a mis queridos amigos de Colombia, especialmente a Carlos, Natalia, Diana, Claudia y Laura.

A los doctores y compañeros del IUPA, Ignacio Morell, Francisco López, Ximo Beltrán, Roque Serrano, Antoni Roig, Elena Pitarch, Carmen Hidalgo, María Ibáñez, Lubertus Bijlsma, Tania Portolés, Aranzazu Peruga, Mercedes Barreda, y a nuestra “secre” Vima, así como a los “chicos” nuevos que comienzan su aventura investigadora en el IUPA. Y a los colegas del SCIC, Cristian Vicent y Jose Pedra, por brindarme toda su ayuda.

A mis colegas de Colombia, Javier Rincón, Cristina Bustos, Carolina Aristizábal y Gustavo Peñuela, por su colaboración en los trabajos que hemos llevado a cabo en nuestro país, así como a los de Argentina, Virginia Aparicio y Eduardo de Gerónimo, por el trabajo realizado en suelos.

A mi querida Transitico, una mujer valiente, con gran fortaleza y sabiduría. Una mujer que nunca se acobardó en los tiempos difíciles. Muchas gracias Mami, por hacer de mí una persona con principios y por ser un ejemplo a seguir. No hay palabras suficientes para describirte.

A mis queridos hermanos, por los gratos momentos vividos en las diferentes etapas de mi vida. Disfruté mucho de su compañía y forman parte de mí.

A mi querida hermanita, por compartir gratos recuerdos y momentos muy especiales. Ella ha sido un vital apoyo en mi vida; día a día me acompaña, aunque sea en la distancia, y escucha todas mis penas y atiende mis dudas. Gracias hermanita, eres un sol.

A mis sobrinos/as, que empiezan poco a poco a vivir su vida; les deseo que tengan la inquietud de aprender y estudiar, porque sólo el conocimiento y una buena preparación les permitirán avanzar en la vida y hacer de ellos personas de bien. Quiero decirles que, a pesar de la distancia, siempre están conmigo en el pensamiento y en el corazón. Y no quiero olvidar al resto de mi familia, que aunque muchos de ellos ya no están físicamente, sé que me acompañan espiritualmente, también a aquellos que están lejos y que han compartido y siguen compartiendo momentos importantes conmigo.

A Félix Jr y Paula, deseándoles que la nueva etapa que comienzan vaya acompañada de éxitos y alegrías, las mismas alegrías que ellos me brindaron desde el primer momento en que los conocí. Ahora, que tengo la oportunidad, quiero decirles que son unas personas maravillosas, con grandes y buenos corazones, que irradian luz y fuerza por donde van y que, sin duda, y así espero, llegaran muy lejos.

Y como no, agradecimiento muy especial a Félix, *"Have I told you lately"*, con quien comparto mi vida diariamente, y que me ha acompañado en toda esta etapa. Gracias por creer en mí y darme la oportunidad de formarme tanto profesional como personalmente. Sin duda, he aprendido mucho durante todo este tiempo. Gracias por tu compañía y apoyo. *"Fill my heart with gladness, take away all my sadness. Ease my troubles, that's what you do. You fill my life with laughter, somehow you make it better. Ease my troubles, that's what you do"*.

Ah, y no puedo olvidarme de *"Maximiliano"*, mi nuevo mejor amigo; sólo digo excelente, excelente, definitivamente el amigo incondicional que todos quisiéramos tener, aunque sea un poco testarudo y con los años se vaya haciendo peor; aun así, no lo cambiaría por nada.

Finalmente, doy gracias a Dios, que lo proyecto como fuerza interior y que me ha permitido culminar este trabajo dándome las fuerzas necesarias para mantenerme en pie todo este tiempo. Él me ha acompañado desde el inicio de mi vida y me ha ayudado a superar duras pruebas. Aunque no esté científicamente demostrado que exista, en mí siento que sí existe, y me ha ayudado a actuar de manera coherente y tener una actitud positiva en los momentos difíciles.

Moltes gràcies a tots els que van ajudar-me en este repte que ha sigut la realització de la Tesi Doctoral. Al llarg de este temps, he pogut fins i tot dependre un poquet de valencià. Saps el que vull dir.

AMBC.